



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
PROGRAMA DE PÓSGRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL
PGBIOEXP

CÍCERA ALEXSANDRA COSTA DOS SANTOS

**DETECÇÃO DE ARBOVÍRUS EM MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE)
CAPTURADOS EM TRÊS ÁREAS FLORESTAIS DO ESTADO DE RONDÔNIA**

PORTO VELHO

2017



CÍCERA ALEXSANDRA COSTA DOS SANTOS

**DETECÇÃO DE ARBOVÍRUS EM MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE)
CAPTURADOS EM TRÊS ÁREAS FLORESTAIS DO ESTADO DE RONDÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental/UNIR, para obtenção do título de Mestrado em Ciências Biológicas com ênfase em Virologia

Orientadora: Dra. Deusilene de Souza Vieira Dall'Acqua

Co-orientadora: Dra. Genimar Rebouças Julião

Porto Velho

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Fundação Universidade Federal de Rondônia
Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo(a) autor(a)

S237d Santos, Cícera.

Detecção de arbovírus em mosquitos (Diptera: Culicidae) capturados em três áreas florestais do Estado de Rondônia / Cícera Santos. -- Porto Velho, RO, 2017.

100 f. : il.

Orientador(a): Prof.^a Dra. Deusilene de Souza Vieira Dall

Coorientador(a): Prof.^a Dra. Genimar Rebouças Julião.

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) - Fundação Universidade Federal de Rondônia

1. arbovírus. 2. mosquitos. 3. taxonomia molecular. I. Dall, Deusilene de Souza Vieira. II. Título.

CDU 573(811.1)

CÍCERA ALEXSANDRA COSTA DOS SANTOS

**DETECÇÃO DE ARBOVÍRUS EM MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE)
CAPTURADOS EM TRÊS ÁREAS FLORESTAIS DO ESTADO DE RONDÔNIA**

Defesa da dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu Mestrado e Doutorado em Biologia Experimental – PGBIOEXP – do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia para obtenção do título de mestre, em sessão pública realizada em 23 de junho de 2017.

Orientadora: Dra. Deusilene de Souza Vieira Dall’Acqua

Co-orientadora: Dra. Genimar Rebouças Julião

Presidente: Assinatura:.....

Nome: Dra. Deusilene Vieira de Souza Vieira Dall’Acqua

Instituição: Universidade Federal de Rondônia / FIOCRUZ RONDÔNIA.

Examinador: Assinatura:.....

Nome: Dr. Christian Collins Kuehn

Instituição: Universidade Federal de Rondônia

Examinador: Assinatura:.....

Nome: Dr. Alexandre de Almeida e Silva

Instituição: Universidade Federal de Rondônia

DEDICATÓRIA

Á Deus por ter me dado forças para não desistir mediante tantas dificuldades. À minha mãe, Maria Lêda, por sempre me apoiar e acreditar nos meus sonhos. Aos meus avós, José Ferreira e Creuza Belém, pelo carinho e amor incondicional. Ao meu amor, Fábio Rocha.

AGRADECIMENTOS

A Deus por abençoar cada dia da minha vida, sustentando-me nos momentos mais difíceis.

A minha orientadora Dra. Deusilene Vieira pela atenção, dedicação e pelo conhecimento adquirido. Registro minha sincera admiração e respeito. Muito obrigada.

A minha co-orientadora Dra. Genimar Rebouças, pelos ensinamentos e dedicação serei eternamente grata.

Ao Dr. Gabriel Ferreira, registro toda minha gratidão pela atenção e ensinamentos.

A toda equipe do laboratório de Virologia Molecular, Entomologia e Genética da Fiocruz/RO, doutorandos, mestrandos, alunos de iniciação científica e estagiários, agradeço pela companhia e auxílio de todos.

A todos os funcionários do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical – CEPEM e FIOCRUZ/RO pelo auxílio, obrigada.

Agradeço aos professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental – UNIR.

Agradeço as plataformas de sequenciamento do Instituto Leônidas e Maria Deane, da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) Amazônia e do Centro de Pesquisa René Rachou.

Ao CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro.

Agradeço a minha família, em especial a minha mãe Maria Lêda e meu padasto Alonso Rodrigues, por sempre me apoiarem e confiarem no meu potencial, ao meu namorado Fábio Rocha pelo amor, paciência e incentivo, aos meus amigos por sempre estarem ao meu lado e tornarem os momentos difíceis mais leves e alegres. Amo vocês.

Enfim, obrigada a todos mencionados ou não, que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho. Sem vocês nada seria possível.

RESUMO

Arbovírus são vírus transmitidos principalmente por artrópodes. Importantes arbovírus como o vírus da dengue constantemente causam surtos, gerando milhões de casos em quase todos os países. Além do que, nas últimas décadas diversos arbovírus emergiram e/ou reemergiram em países do Novo Mundo. Vírus que antes eram restritos as regiões da África e talvez da Ásia, como o vírus Zika e o vírus chikungunya, invadiram novos continentes causando grandes transtornos na saúde pública. Atualmente aproximadamente 300 espécies de mosquitos podem transmitir arbovírus, sendo o *Aedes* spp e o *Culex* spp os principais vetores de importância médica em seres humanos. A maioria dos arbovírus é mantido circulante entre os animais silvestres e ações desenvolvidas pelo homem em áreas florestais constituem risco evidente de contaminação por arbovírus uma vez que os animais e vetores são deslocados dos seus ambientes naturais e se mantêm próximos ao homem. A identificação de mosquitos transmissores de arbovírus é essencial para o controle desses vetores, geralmente a partir das características morfológicas que distinguem as espécies de mosquitos, porém, esse método de identificação apresenta limitações, sendo de extrema importância a utilização de métodos moleculares que aperfeiçoe e facilite a correta identificação da diversidade biológica. Este trabalho teve como objetivos (i) descrever a frequência de espécies de Culicinae capturadas em três áreas florestais do estado de Rondônia; (ii) testar a região 5' do gene COI como marcador molecular para identificação de morfotipos do gênero *Culex*; e identificar e caracterizar molecularmente arbovírus em mosquitos. A captura dos mosquitos foi realizada nas áreas florestais de Santo Antônio, São Vicente e Flona do Jamari, utilizando armadilhas CDC e BG. A identificação por DNA *Barcode* de morfotipos de *Culex* foi através do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase 1 (COI). Mosquitos selecionados da subfamília Culicinae foram processados para detecção de flavivírus, vírus chikungunya, vírus Mayaro e vírus Oropouche por PCR convencional. Dos espécimes de mosquitos analisados para detecção de arbovírus, os gêneros mais predominantes foram *Culex* (43,46%), *Coquillettidia* (20,85%), *Aedeomyia* (19,8%), *Mansonia* (9,4%) e *Aedes* (1,9 %). Dez sequências foram obtidas do gene COI a partir de morfotipos do gênero *Culex*. A análise molecular das sequências do gene COI permitiu a identificação das espécies *Culex bastagarius* e *Culex idottus* entre os exemplares de morfotipos de *Culex*. Em dois exemplares não foi possível identificar a espécie, provavelmente devido à ausência de sequência do gene COI conhecida ou depositada no GenBank. Observou-se que o marcador do gene COI provavelmente não é eficaz na diferenciação de espécies do complexo Coronator de *Culex*. Do total de 3.837 espécimes de Culicinae analisados nenhum foi positivo para arbovírus. Potenciais vetores de arbovírus foram analisados no presente estudo. A identificação de morfotipos do gênero *Culex* através da região 5' do gene COI mostrou ser marcador eficaz, sendo necessários mais estudos para depósito no banco de dados das sequências do COI das diferentes espécies deste gênero. Arbovírus de extrema importância médica foram pesquisados em Culicinae nesse estudo, porém, é comum em estudos com mosquitos, encontrar baixas taxas de infecção, assim como amostra sem nenhum indivíduo infectado, pois, alguns fatores como a baixa carga viral, o período de não epizootia durante a captura, assim como a quantidade de espécimes analisadas, podem ter influenciado na ausência de detecção de mosquitos infectados por arbovírus.

Palavras-chave: Amazônia. PCR. taxonomia molecular. COI.

ABSTRACT

Arboviruses are viruses transmitted primarily by arthropods. Important arboviruses like the dengue virus constantly cause outbreaks, generating millions of cases in almost every country. In addition, in the last decades several arboviruses have emerged and / or re-emerged in New World countries. Viruses previously restricted to regions of Africa and perhaps Asia, such as the Zika virus and the chikungunya virus, have invaded new continents causing major public health problems. Currently about 300 species of mosquitoes can transmit arboviruses, with *Aedes* spp and *Culex* spp being the main vectors of medical importance in humans. Most arboviruses are kept circulating between wild animals and man-made actions in forested areas constitute a clear risk of arbovirus contamination as the animals and vectors are displaced from their natural environments and remain close to humans. The identification of mosquitoes transmitting arboviruses is essential for the control of these vectors, usually based on the morphological characteristics that distinguish mosquito species. However, this method of identification has limitations, and it is extremely important to use molecular methods that optimize and facilitate the correct identification of biological diversity. This work had as objectives (i) to describe the frequency of Culicinae species captured in three forest areas of the state of Rondônia; (ii) testing the 5' region of the COI gene as a molecular marker for the identification of *Culex* morphotypes; and to identify and characterize molecularly arboviruses in mosquitoes. Mosquito capture was carried out in the forest areas of Santo Antônio, São Vicente and Flona do Jamari, using CDC and BG traps. Identification by Barcode DNA of *Culex* morphotypes was via the mitochondrial gene Cytochrome C Oxidase 1 (COI). Selected mosquitoes from the Culicinae subfamily were processed for detection of *flavivirus*, chikungunya virus, Mayaro virus and Oropouche virus by conventional PCR. The most prevalent species were *Culex* (43.46%), *Coquillettidia* (20.85%), *Aedeomyia* (19.8%), *Mansonia* (9.4%) and *Aedes* (1.9%). Ten sequences were obtained from the COI gene from morphotypes of the genus *Culex*. The molecular analysis of the sequences of the COI gene allowed the identification of the species *Culex bastagarius* and *Culex idottus* among the specimens of *Culex* morphotypes. In two specimens it was not possible to identify the species, probably due to the lack of sequence of the known COI gene or deposited in GenBank. It has been observed that the COI gene marker is probably not effective in species differentiation of the *Culex Coronator* complex. Of the total of 3,837 specimens of Culicinae analyzed, none were positive for arboviruses. Potential arbovirus vectors were analyzed in the present study. The identification of morphotypes of the genus *Culex* through the 5' region of the COI gene was shown to be an efficient marker, requiring further deposition studies in the COI sequences database of the different species of this genus. Arboviruses of extreme medical importance were studied in Culicinae in this study, however, it is common in studies with mosquitoes to find low infection rates, as well as a sample with no infected individual, since some factors such as low viral load, non-epizootic period during capture, as well as the amount of specimens analyzed, may have influenced the absence of detection of mosquitoes infected by arboviruses.

Keywords: Amazon. PCR. molecular taxonomy. COI.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de transmissão de arbovírus.....	15
Figura 2. Organização do genoma de <i>Flavivirus</i>	16
Figura 3. Ciclo de replicação dos <i>Flavivirus</i>	17
Figura 4. Organização do genoma dos <i>Alphavirus</i> com as principais funções proteicas.....	24
Figura 5. Ciclo de replicação do <i>Alphavirus</i>	25
Figura 6. Estratégia de codificação do genoma <i>Orthobunyavirus</i>	28
Figura 7. Ciclo de replicação de <i>Orthobunyavirus</i>	29
Figura 8. Infecção do mosquito vetor por arbovírus e barreiras teciduais.....	31
Figura 9. Ciclo de vida dos mosquitos.....	35
Figura 10. Localização das áreas estabelecidas para as coletas entomológicas de potenciais vetores de arbovírus.....	44
Figura 11. Armadilhas utilizadas para captura de insetos.....	45
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose da PCR do gene <i>coI</i>	57
Figura 13. Árvore filogenética do conjunto de dados das sequências do gene COI de morfotipos do gênero <i>Culex</i> desse estudo e sequências do gene COI de espécies de <i>Culex</i> depositadas no GenBank.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da família Culicidae.....	34
Tabela 2. Descrição dos pares de iniciadores utilizados na PCR.....	52
Tabela 3. Número de pools e de espécimes processados individualmente para detecção de arbovírus conforme local de estudo durante as três amostragens.....	54
Tabela 4. Distribuição de mosquitos processados para detecção de arbovírus conforme gêneros coletados durante as três amostragens.....	54
Tabela 5. Descrição dos exemplares processados segundo local de captura, gênero, subgênero, espécie ou morfotipos nos três eventos de amostragem nas áreas de florestas de Rondônia.....	54
Tabela 6. Descrição dos espécimes submetidos à identificação por DNA <i>Barcode</i>	57
Tabela 7. Lista de sequências do gene COI de espécies do gênero <i>Culex</i> depositadas no GenBank.....	58
Tabela 8. Delimitação inicial das espécies pelo ABGD do conjunto de dados das sequências desse estudo (em negrito) e sequências depositadas no GenBank (código de acesso).....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

BFV	Vírus da floresta Barmah
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BUNV	Vírus Bunyawera
CDC	Center of Disease Control and Prevention
cDNA	DNA complementar
CEV	Vírus de encefalite da Califórnia
CHIKV	Vírus chikungunya
COI	Citocromo C oxidase subunidade I
DENV	Vírus dengue
EEEV	Vírus da encefalite equina Oriental
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação de Biodiversidade
JBEV	Vírus da encefalite Japonesa
MAYV	Vírus Mayaro
MEB	Barreira de escape do intestino médio
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MIB	Barreira de infecção do intestino médio
MIR	Taxa de infecção mínima
MMA	Ministério da Saúde Ambiente
MTase	Metiltransferase dependente
NS	Proteínas não estruturais
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ONNV	O'nyong-nyong
OROV	Vírus Oropouche
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RRV	Vírus Ross River
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
SGEB	Barreira de escape da glândula salivar
SAM	S-adenosil-I-metionina
SGB	Síndrome de Guillain-Barré

SGIB	Barreira de infecção da glândula salivar
SINV	Vírus Sinbdis
TAE	Tampão Tris-Acetate
TBE	Vírus da encefalite transmitida por carrapatos
UTR	Unidade não traduzida
VC	Competência vetorial
VEEV	Vírus da encefalite equina Venezuelana
WEEV	Vírus da encefalite equina Ocidental
WNV	Vírus do Nilo Ocidental
YFV	Vírus da febre amarela
ZIKAV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. ARBOVÍRUS.....	14
1.1.1. <i>Flavivirus</i>	14
1.1.1.1. Vírus dengue	18
1.1.1.2. Vírus Zika.....	19
1.1.1.3. Vírus da febre amarela	20
1.1.1.4. Encefalites	22
1.1.2. <i>Alphavirus</i>	23
1.1.2.1. Vírus chikungunya	24
1.1.2.2. Vírus Mayaro.....	26
1.1.3. <i>Orthobunyavirus</i>	27
1.1.3.1. Vírus Oropouche	29
1.2. CICLO DE TRANSMISSÃO DE ARBOVÍRUS	30
1.3. EMERGÊNCIA DE ARBOVÍRUS	31
1.4. VETORES DE ARBOVÍRUS	33
1.4.1. <i>Culicídeos</i>	33
1.4.1.1. Identificação Taxonômica	37
1.4.1.1.1. Identificação biológica através do DNA Barcode.....	38
2. JUSTIFICATIVA.....	40
3. OBJETIVOS.....	41
3.1. OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	42
4.2. ÁREA DE ESTUDO	42
4.3. CAPTURA DOS MOSQUITOS	42
4.4. TRIAGEM E ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS	44
4.5. IDENTIFICAÇÃO POR DNA BARCODE.....	45
4.5.1. Extração do DNA.....	45
4.5.2. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR do gene COI	46

4.5.3.	Purificação do produto da PCR	46
4.5.4.	Sequenciamento e Análise das sequências.....	47
4.5.4.1.	Delimitação das espécies.....	47
4.5.4.2.	Análise Filogenética	48
4.6.	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ARBOVÍRUS EM MOSQUITOS.....	48
4.6.1.	Seleção de pools.....	48
4.6.2.	Controle Positivo	48
4.6.3.	Extração do RNA viral.....	48
4.6.4.	Reação de Transcrição Reversa	49
4.6.5.	Reação em Cadeia da Polimerase – PCR Convencional.....	49
4.6.5.1.	Análise in sílico	49
4.6.5.2.	Análise in vitro	50
4.6.5.2.1.	PCR do gene NS5 de Flavivirus	50
4.6.5.2.2.	PCR do gene do envelope de chikungunya.....	50
4.6.5.2.3.	PCR Duplex.....	51
4.6.5.2.4.	Análise do Produto Amplificado	51
5.	RESULTADOS.....	52
5.1.	MOSQUITOS	52
5.2.	IDENTIFICAÇÃO POR DNA BARCODE.....	55
5.3.	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ARBOVÍRUS EM MOSQUITOS.....	65
5.3.1.	Análise in sílico	65
5.3.2.	Análise in vitro	65
6.	DISCUSSÃO.....	66
7.	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	76
	ANEXO A - Protocolo de autorização expedido pelo SISBIO	95
	ANEXO B - Exemplo de Prancha Pictórica para determinação de morfoespécies de <i>Culex</i> spp. durante as capturas em três áreas florestais de Rondônia.....	96

1. INTRODUÇÃO

1.1. ARBOVÍRUS

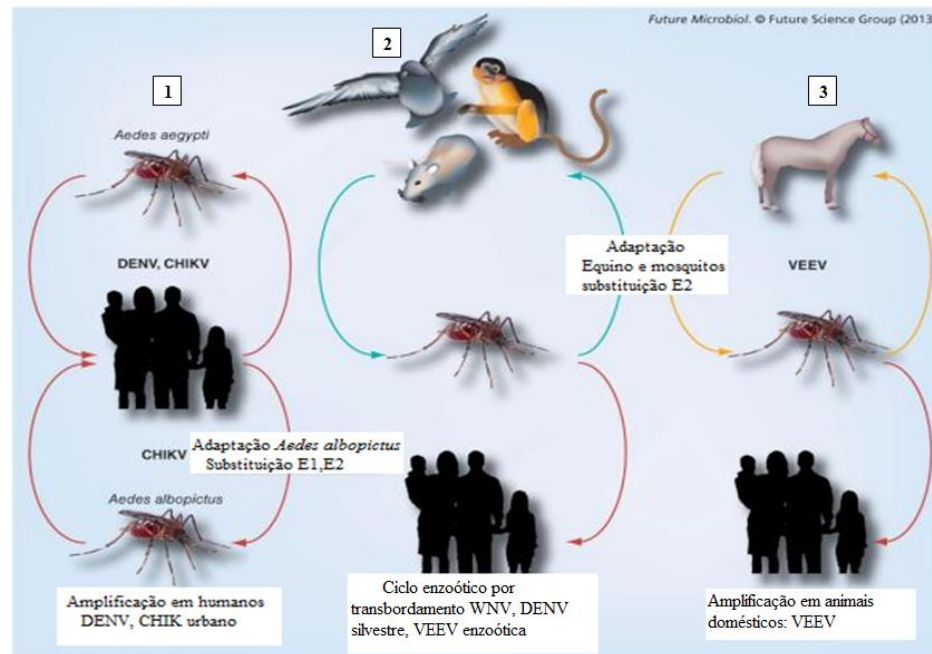
Arbovírus são vírus transmitidos geralmente por artrópodes, tendo uma distribuição global, acometendo principalmente populações de países tropicais e subtropicais, considerados um dos grandes problemas na saúde pública (MOTA *et al.*, 2016). A maioria dos arbovírus se mantém em ciclos enzoótico, ou seja, circulante entre os animais silvestres (SAIZ *et al.*, 2016; WEAVER, 2013), tendo como hospedeiros amplificadores os animais vertebrados como as aves, primatas e mamíferos (COFFEY *et al.*, 2013).

Alguns arbovírus estenderam o espaço geográfico dos seus ciclos enzoótico, geralmente em razão do comércio humano ou viagens, desencadeando arbovirose em humanos, devido às infecções por *spillover* enzoótica, que consistem em transmissão de arbovírus de animais infectados por vetores enzoóticos para os seres humanos, que comumente não desenvolvem viremia o suficiente para ampliar a cadeia de transmissão. Entretanto, importantes arbovírus não só infectam pessoas por *spillover* como também utilizam os seres humanos nos ciclos urbanos como hospedeiros amplificadores gerando alta viremia (Figura 1) (COFFEY *et al.*, 2013; WEAVER, 2013).

Atualmente no Catálogo Internacional de Arbovírus são listados 537 vírus (CDC, 2016). Destes, 134 foram relatados por desencadarem doenças em humanos. A maioria dos arbovírus de importância médica pertence às famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae* e *Bunyaviridae* (GUBLER, 2002).

1.1.1. *Flavivirus*

O gênero *Flavivirus* pertence à família *Flaviviridae*, possui 53 espécies taxonomicamente reconhecidas (ICTV, 2015). Com mais de 40 espécies responsáveis por causarem doenças em humanos, como o vírus da dengue (DENV), o vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus da encefalite japonesa (JBEV), vírus da febre amarela (YFV), vírus da encefalite transmitida por carrapato (TBEV) e o vírus Zika (ZIKV) (JORDAN; RANDALL, 2016; MOUREAU *et al.*, 2015). A maioria dos *flavivirus* é transmissível ao homem por meio de um inseto vetor (JORDAN; RANDALL, 2016). Dos vetores reconhecidos, os mais importantes são os mosquitos do gênero *Aedes* os quais são distribuídos entre as regiões tropicais e subtropicais do globo (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

FIGURA 01: Ciclo de transmissão de arbovírus em diferentes cenários

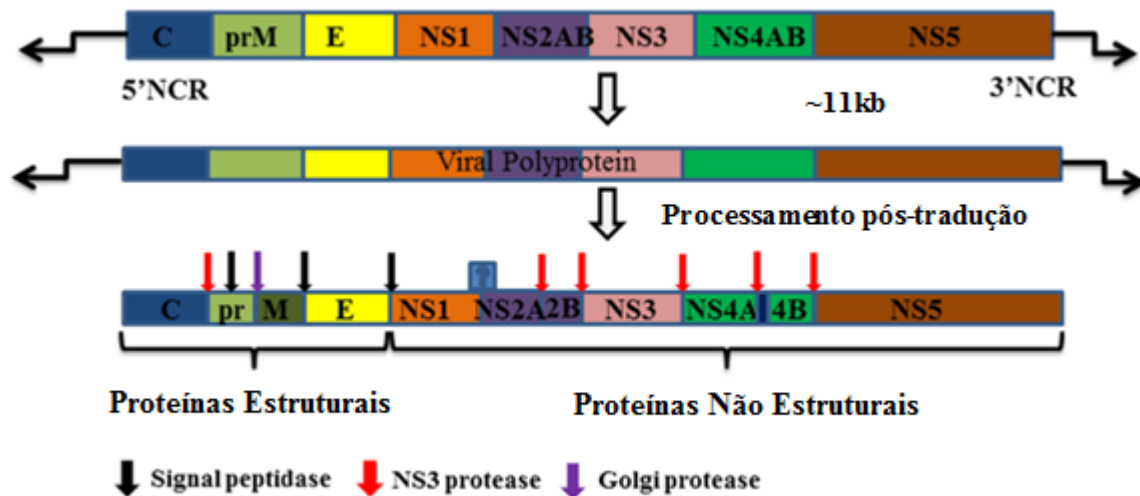
Legenda: 1- Arbovírus com ciclos endêmicos / epidêmicos em habitats urbanos que envolvem os humanos como hospedeiros de amplificação (chikungunya - CHIKV, dengue - DENV urbanos). A adaptação do CHIKV ao *Aedes albopictus* devido a mutações na glicoproteína E1 e E2 do CHIKV. 2- Arbovírus com ciclo enzootico ancestral (vírus do Nilo Ocidental - WNV, DENV silvestre, vírus da encefalite equina Venezuelana - EEEV enzootica). Adaptação do VEEV a equinos e mosquitos devido a mutações na glicoproteína E2. 3- Arbovírus com ciclos de epizootias que envolvem amplificação por animais domesticados, tais como cavalos (VEEV). Fonte: Adaptado de COFFEY *et al.*, 2013.

Os *Flavivirus* são vírus de RNA fita simples de sentido positivo, envelopados e com partícula viral de aproximadamente 50 nm de diâmetro. No citoplasma das células infectadas o genoma de RNA dos *flavivirus* é diretamente traduzido em uma poliproteína. Devido à atuação das proteases do hospedeiro e do vírus, a poliproteína é clivada e processada em três proteínas estruturais: proteína do envelope (E), proteína do capsídeo (C) e proteína de membrana precursora (prM) e sete proteínas não estruturais (NS) denominadas pela nomenclatura alfanumérica de: NS1, NS2a, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 2). A NS1 é uma proteína não estrutural glicosilada, a qual existe tanto na forma intracelular (mNS1) quanto na forma extracelular secretada. A NS1 é necessária para a replicação viral e desencadeia resposta imune (RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016).

As proteínas não estruturais NS3 e NS5, são as principais enzimas no complexo de replicação, pois, em conjunto, representam todas as atividades catalíticas essenciais para a replicação do genoma e o bloqueio de RNA na unidade não traduzida - UTR 5' (KLEMA *et al.*,

2016). A proteína NS5 é a maior e mais conservada proteína não estrutural, possuindo na sua extremidade N-terminal uma metiltransferase dependente (MTase) de S-adenosil-I-metionina (SAM) e na porção C-terminal uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (ZHANG *et al.*, 2016).

FIGURA 2: Organização do genoma de *Flavivirus*



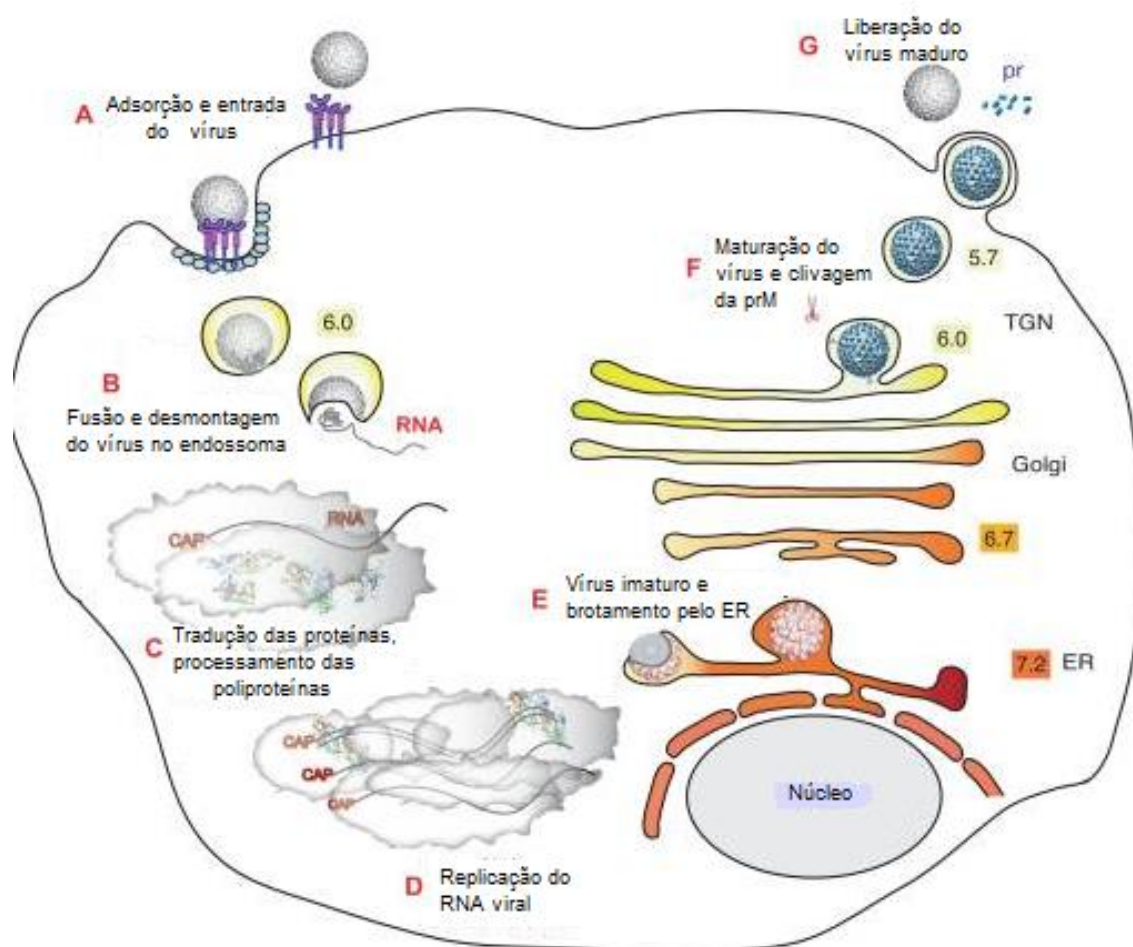
Fonte: Adaptado de RASTOGI *et al.*, 2016.

A entrada de *flavivirus* nas células hospedeiras, se dá por meio de endocitose mediada por receptores. Diferentes receptores foram identificados por internalizar o vírus nas células hospedeiras, como o proteoglicanos de sulfato de heparina, GRP78 (proteína regulada pela glicose 78), Hsps (proteína de choque térmico) 70 e 90, CD14 e CD4, colesterol. Após a internalização, a acidificação do endossoma desencadeia alterações conformacionais nas glicoproteínas estruturais do vírus, formando poros por onde o RNA viral de sentido positivo é liberado no citoplasma. Inicialmente o RNA atua como RNAm sendo diretamente traduzido em uma única poliproteína que é clivada por proteases virais e do hospedeiro em 3 proteínas estruturais (C, prM e E) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (PERERA-LECOIN *et al.*, 2013; RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016).

As proteínas não estruturais irão replicar o RNA viral. Recém-sintetizado, o RNA e a proteína do capsídeo são envolvidos por glicoproteínas prM e E para montagem das partículas virais imaturas que brotam no retículo endoplasmático (ER). As partículas virais imaturas são transportadas para o aparelho de Golgi. No pH baixo do trans-Golgi, ocorre a maturação do vírus,

através da clivagem mediada por furina da prM a proteína de membrana (M). Após a maturação, o vírus está maduro o suficiente para infectar novas células. As diferenças nos ambientes celulares e a ausência de lise das células infectadas, possibilita que a entrada, replicação e montagem do vírus, ocorra de forma diferente em células de mosquitos e em células de vertebrados (Figura 3) (PERERA-LECOIN *et al.*, 2013; RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016).

Figura 3: Ciclo de Replicação dos *flavivirus*



Legenda: A. Os viriões se ligam as moléculas e receptores de superfície celular e são internalizados por endocitose. B. A acidificação do endossoma, permite a desmontagem do vírus, liberando o RNA no citoplasma. C. O RNA viral é traduzido em uma poliproteína que é processada por proteases virais e celulares. D. As proteínas não estruturais replicam o RNA do genoma. E. A montagem do vírus ocorre na membrana do ER, sendo a proteína do capsídeo e o RNA viral envolvidos pela membrana do ER e glicoproteínas para formar partículas imaturas do vírus. F. As partículas virais imaturas são transportadas para o aparelho de Golgi. No pH baixo do trans-Golgi, ocorre a maturação do vírus, através da clivagem mediada por furina da prM a M. G. O vírus é liberado do citoplasma. Fonte: Adaptado de PERERA-LECOIN *et al.*, 2013.

1.1.1.1. Vírus dengue

O vírus dengue, pertence ao gênero *Flavivirus*, transmitido ao homem através de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Existem quatro sorotipos distintos (DENV1-4) (CHEN; VASILAKIS, 2011). Entre as doenças causadas por *flavivirus* a dengue é considerada a com mais rápida disseminação, sendo endêmica em mais de 100 países, representando 40% da população mundial que vive em áreas com risco de dengue (WHO, 2017a).

No Brasil foram notificados em 2016, 1.496.282 casos prováveis de dengue e 629 óbitos. Nesse período 2,6% (38.902 casos) foi registrado na Região Norte, sendo que destes 7.472 casos foram notificados no estado de Rondônia. (SVS-MSa, 2017). Até a 15ª semana epidemiológica (01/01/2017 a 15/04/17) notificaram 113.381 casos prováveis de dengue, destes 14% (15.823) foram registrados na Região Norte (SVS-MS, 2017d).

No decorrer da infecção natural por dengue em seres humanos, o mosquito introduz o vírus no epitélio da pele (KHETARPAL; KHANNA, 2016) que infecta e se replica em células de linhagem de células mononucleares como monócitos, células dendríticas, macrófagos e células de Langerhans (JESSIE *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2000). Entretanto, em mosquitos, a replicação do DENV ocorre primeiramente no intestino médio e depois se dissemina e replica nas glândulas salivares, por onde é transmitido ao hospedeiro pelo mosquito infectado (KHETARPAL; KHANNA, 2016; MOLINA-CRUZ *et al.*, 2005; SALAZAR *et al.*, 2007).

As infecções pelo vírus da dengue, em até 75% dos casos, são assintomáticas, porém, quando sintomática, causa uma doença sistêmica e dinâmica de amplo espectro clínico, que vai desde uma dengue autolimitada até uma dengue grave, uma síndrome de vazamento hemorrágico e capilar potencialmente letal. A dengue autolimitada caracteriza-se por ser uma doença febril com início abrupto, com dores de cabeça, dores musculares e articular intensa e erupção cutânea, com duração normalmente de 7 a 14 dias. Na dengue grave, há um rápido aparecimento de derrame capilar com trombocitopenia e lesão hepática leve a moderada. As manifestações hemorrágicas incluem sangramento na pele e no trato gastrointestinal. A rápida perda de fluidos teciduais causa a hemoconcentração e hipotensão que podem levar ao óbito (DIAMOND; PIERSON, 2015).

1.1.1.2. Vírus Zika

O vírus Zika foi isolado pela primeira vez a partir do soro de um macaco febril sentinela Rhesus (*Macaca mulata*), durante um estudo sobre o vírus da febre amarela (YFV) na floresta Zika em Uganda em abril de 1947 (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Possui duas linhagens: a linhagem Africana, que inclui cepas de ZIKV isoladas na África Central Ocidental e a linhagem Asiática com cepas isoladas no Sudeste Asiático, na região do Pacífico e as cepas humanas contemporâneas das Américas (BARZON *et al.*, 2016). Os mosquitos *Aedes aegypti* são considerados os principais vetores do ZIKV (ECDC, 2015). Porém, o *Aedes albopictus* foi relatado como potencial vetor (WONG *et al.*, 2013).

O vírus Zika era um *flavivirus* pouco conhecido antes de causar um surto na Ilha de Yap dos Estados Federados da Micronésia em 2007 (DUFFY *et al.*, 2009). Apesar do episódio, o ZIKV não era considerado um patógeno emergente importante, pois as manifestações clínicas da doença eram geralmente leves. Entretanto, relatos recentes sobre a possível associação entre a infecção por ZIKV e uma epidemia de microcefalia entre neonatos no Brasil atraiu a atenção mundial (JOHANSSON *et al.*, 2016).

A disseminação rápida do ZIKV além da África e Ásia para as Américas e Europa, e as potenciais novas “Síndromes de Zika congênita” levaram a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar em 1º de fevereiro de 2016 a epidemia de ZIKV como uma emergência global de saúde pública (CHAN *et al.*, 2016; “WHO, 2017b). Atualmente 48 países e territórios das Américas confirmaram transmissão autóctone da doença causada pelo vírus Zika desde 2015. Além disso, cinco países da América incluindo a Argentina, Canadá, Chile, Peru e os Estados Unidos relataram a transmissão sexual do ZIKV (PAHO-WHO, 2017). No Brasil, em 2016 foram confirmados 128.266 casos e 6 óbitos pelo vírus Zika. Em relação às gestantes, foram confirmados 10.820 casos, confirmando 2.366 casos de microcefalia em recém-nascidos. (SVS-MS, 2017a). Até a 15ª Semana epidemiológica (1/1/2017 – 15/4/2017) se tem registrado 7.911 casos prováveis de infecção pelo ZIKV, com 293 casos confirmados em gestantes (SVS-MS, 2017d).

Embora o principal mecanismo de transmissão seja por mosquitos, o genoma do ZIKV foi detectado no fluido amniótico de mulheres grávidas, reforçando a possível associação do vírus e os casos de microcefalia no Brasil, sugerindo que o ZIKV pode atravessar a barreira placentária (CALVET *et al.*, 2016). Geralmente as manifestações clínicas são suaves, apresentando sintomas

como febre, erupção cutânea, dor nas articulações e conjuntivite. A durabilidade dos sintomas é de alguns dias a uma semana, devido à sintomatologia leve os casos de mortes são raros (CDC, 2017).

A patogênese da infecção por ZIKV é quase desconhecida, a maioria dos estudos recentes sobre os mecanismos patogênicos do ZIKV estão sendo direcionados aos tipos de células envolvidas na transmissão placentária e nos danos neurais (BARZON *et al.*, 2016). Porém, assim como outros *flavivirus* transmitidos por mosquitos, provavelmente o ZIKV se replica em células dendríticas próximas ao local de inoculação, disseminando-se para os gânglios linfáticos e corrente sanguínea (DIAMOND *et al.*, 2003; HAYES, 2009) podendo atingir os demais órgãos/tecidos como o sistema nervoso, os músculos esqueléticos, miocárdio e talvez o feto após atravessar a placenta. O neurotropismo e a persistência do ZIKV, demonstrado em estudos, podem justificar as anomalias fetais como a microcefalia, associada a este vírus (CHAN, J. F. W. *et al.*, 2016).

A infecção pelo ZIKV também tem sido associada com a síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma doença autoimune que causa paralisia flácida aguda ou subaguda. Tal associação foi fortemente sustentada quando 42 indivíduos da Polinésia Francesa foram diagnosticados com a SGB e todos possuíam anticorpos neutralizantes para o vírus Zika (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016).

Em seres humanos, o RNA viral é detectável no sangue até os 10 primeiros dias após a infecção, apresentando maior pico de carga viral quando iniciam os sintomas. A excreção do vírus durante as primeiras semanas após a infecção é relativamente alta, na urina, saliva e outros fluidos corporais, os mecanismos envolvidos no tropismo do ZIKV pelo testículo e a sua excreção no sêmen, mesmo após a sua depuração no sangue são desconhecidos (BARZON *et al.*, 2016).

1.1.1.3. Vírus da febre amarela

O vírus da febre amarela (YFV) é um *flavivirus* responsável por causar uma doença viral aguda com sintomas como febre hemorrágica e icterícia (VOLK *et al.*, 2009). Possui sete genótipos, dois sul-americanos (divididos entre os do leste e oeste do continente) e cinco africanos (África Ocidental genótipo I, África Ocidental genótipo II, genótipo da África Oriental

e Central, genótipo da África Oriental e genótipo da Angola) (BEASLEY; MCAULEY; BENTE, 2015; BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007; MUTEBI *et al.*, 2001).

O YFV é mantido na natureza através da transmissão entre primatas não humanos considerados seus principais hospedeiros e mosquitos hematófagos principalmente as espécies do gênero *Haemagogus* e *Sabethes* na América do Sul e do gênero *Aedes* (*Stegomyia*) como *Aedes africanus* na África e por transmissão vertical nesses vetores (MONATH; VASCONCELOS, 2015; THOMAS, 2016).

Em meados do ano de 1600 até o início do século XX, o YFV foi considerado uma importante ameaça para saúde humana, sendo responsável por diversas epidemias em toda a América, África e algumas regiões da Europa, apresentando alta taxa de letalidade geralmente superior a 20% (BEASLEY; MCAULEY; BENTE, 2015). A identificação do mosquito *Aedes aegypti* como transmissor do YFV em 1900, com posteriores medidas de controle do vetor, resultou em o declínio da febre amarela em regiões que estavam fora da zona endêmica tropical como a América do Norte, Caribe e Europa (MONATH; VASCONCELOS, 2015).

Na década de 1930 foram desenvolvidas duas vacinas vivas e atenuadas do YFV, sendo intensamente implantada em 1940, o que levou a um novo declínio da doença. A ocorrência de surtos periódicos da febre amarela desde então se deve à ausência de uma rotina de programas de imunização (MONATH; VASCONCELOS, 2015).

Os seres humanos são infectados esporadicamente pelo YFV ao serem picados por mosquitos silvestres que se alimentaram de macacos com alta viremia ocasionando a febre amarela silvestre. Além do mais os seres humanos podem ser utilizados como hospedeiros amplificadores, ou seja, possuindo alta viremia para a transmissão interurbana, principalmente pelos mosquitos *Aedes aegypti* desencadeando a febre amarela urbana (MONATH; VASCONCELOS, 2015).

No Brasil, desde 1942, não há relato de febre amarela urbana (DYER, 2017), enquanto o último período epidêmico de febre amarela silvestre havia sido registrado entre 2007 e 2009 afetando principalmente população de áreas com baixas coberturas vacinais. Porém, entre julho/2014 e dezembro/2016 registrou-se um período de reemergência do vírus da febre amarela na região extra-amazônica, confirmando 15 casos humanos com locais prováveis de infecções nos estados de Goiás (9), Pará (2), Mato Grosso do Sul (1), São Paulo (2) e Amazonas (1), sendo também confirmados no mesmo período 49 epizootias de primatas não humanos para febre

amarela nos estados de São Paulo (16), Goiás (12), Distrito Federal (8), Tocantins (7), Minas Gerais (5) e Pará (1) (MS, 2017).

Atualmente no Brasil, desde dezembro/2016 a 10/2/2017 foram notificados 1.170 casos suspeito de febre amarela, destes confirmou-se 230 casos dos quais 79 casos evoluíram para óbito, apresentando uma taxa de letalidade de 34,4%. A maioria dos casos confirmados foi registrada no estado de Minas Gerais, possuindo um perfil demográfico típico de febre amarela silvestre acometendo principalmente homens economicamente ativos, pois esses indivíduos se expõem com maior frequência a áreas e situações de risco em razão dos seus serviços em áreas rurais (SVS-MS, 2017c).

Ao contrário da maioria dos *flavivirus* que têm tropismo para o cérebro ou, no caso do DENV, que atingem as células de origem do retículo endotelial, o YFV tem tropismo para o fígado causando uma doença viscerotrópica (VOLK *et al.*, 2009). Há replicação viral intensa nos gânglios linfáticos com posterior disseminação sistêmica para a medula óssea, baço e fígado, causando neste degeneração hepatocelular (QUARESMA *et al.*, 2013; THOMAS, 2016). O período de incubação do vírus no homem varia de 3 a 6 dias, apresentando sintomas iniciais como dores de cabeça, febre, dores musculares e articulares, falta de apetite e vômitos, podendo evoluir para icterícia e falência multiorgânica (THOMAS, 2016).

1.1.1.4. Encefalites

O gênero *Flavivirus* também possui alguns dos mais importantes vírus responsáveis por causarem encefalites em seres humanos, como o vírus da encefalite japonesa (JBEV), o vírus do Nilo Ocidental (WNV) e o vírus da encefalite transmitido por carrapatos (TBEV). Geralmente, a maioria dos indivíduos não desenvolve a doença, porém uma minoria desencadeia uma doença grave com grande possibilidade de danos neurológicos permanentes ou morte (TURTLE; GRIFFITHS; SOLOMON, 2012).

Em dezembro de 2014, foi anunciado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) o primeiro caso de infecção em humanos pelo WNV no Brasil (VIEIRA *et al.*, 2015). Nenhum outro caso de WNV foi notificado no Brasil até o momento, porém não significa a ausência de circulação do vírus, pois o diagnóstico em áreas rurais se limita aos sintomas clínicos, além do que possui sintomas similares a outras arboviroses, o que pode acabar sendo negligenciada e deixando de ser notificada (SILVA; SILVA, 2016).

1.1.2. *Alphavirus*

O gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*, contém 31 espécies de vírus taxonomicamente reconhecidas (ICTV, 2015). A maioria é transmitida entre hospedeiros vertebrados por mosquitos. Estes são subdivididos com base na sua origem geográfica (FROS; PIJLMAN, 2016).

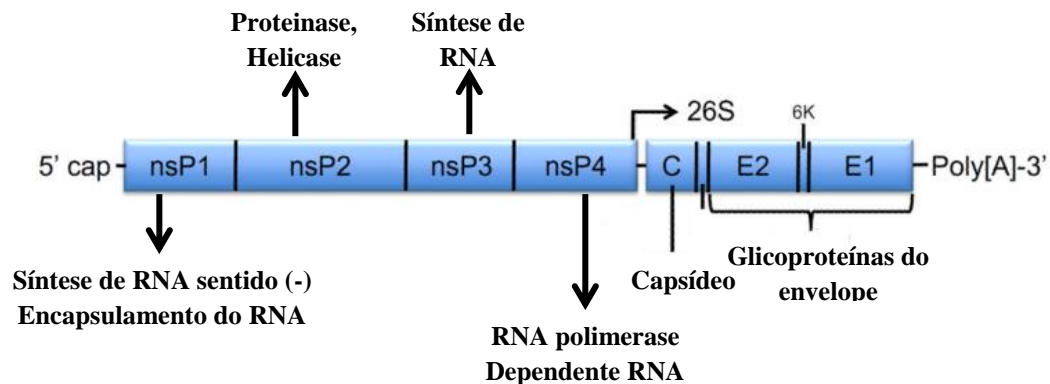
Alphavirus do Novo Mundo geralmente são responsáveis pelas encefalites em seres humanos como o vírus da encefalite Venezuelana (VEEV), vírus da encefalite equina Ocidental (WEEV), vírus da encefalite equina Oriental (EEEV). Os do Velho Mundo estão relacionados às síndromes de artralgia como o vírus Ross River (RRV), vírus da floresta Barmah (BFV), vírus Mayaro (MAYV), vírus O'nyong-nyong (ONNV), vírus chikungunya (CHIKV) e o vírus Sindbis (SINV) (POWERS *et al.*, 2001).

O genoma do *alphavirus* é um RNA de sentido positivo, cadeia simples, com tamanho aproximado de 11,7 kb (SCHMALJOHN; MCCLAIN, 1996). Contém uma região 5'cap e 3'com cauda poli-A que codifica duas regiões de leituras abertas (ORFs). A ORF N-terminal sintetiza a poliproteína não estrutural denominada P1234 que codifica quatro proteínas não estruturais (nsP1- nsP4) as quais atuam na transcrição e replicação do RNA viral, na clivagem da poliproteína e encapsulamento do RNA. A ORF C-terminal codifica a poliproteína estrutural que sofre clivagem e modificações pós traducionais para formar a proteína do capsídeo, glicoproteínas do envelope E2 e E1 e duas proteínas menores a E3 que possui atividade de isomerase de dissulfeto contribuindo para a dobragem correta e a formação da ligação dissulfeto nas glicoproteínas virais, e a 6k uma proteína hidrofóbica necessária para a montagem de partículas virais (Figura 4) (BALA MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016; CHAN, M.; JOHANSSON, 2012; LEUNG; NG; CHU, 2011).

Os *alphavirus* infectam as células suscetíveis a partir de receptores específicos dos hospedeiros, os quais variam entre as diferentes espécies do gênero *Alphavirus*, acredita-se que sejam proteicos, apesar de fatores de ligação não-proteicos auxiliarem na ligação inicial do vírus na célula. A glicoproteína viral E2 é a principal responsável pela interação do vírus com o receptor, apesar, da proteína E1 possa também auxiliar. Após a entrada do vírus na célula, devido à acidificação do endossoma, há uma desestabilização do heterodímero E1-E2, formando poros

que permitem a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma, em seguida, o genoma encapsulado é exposto para ser traduzido (JOSE; SNYDER; KUHN, 2010).

FIGURA 4 - Organização do genoma dos *Alphavirus* com as principais funções proteicas listadas



Fonte: Adaptado de WEAVER et al., 2012.

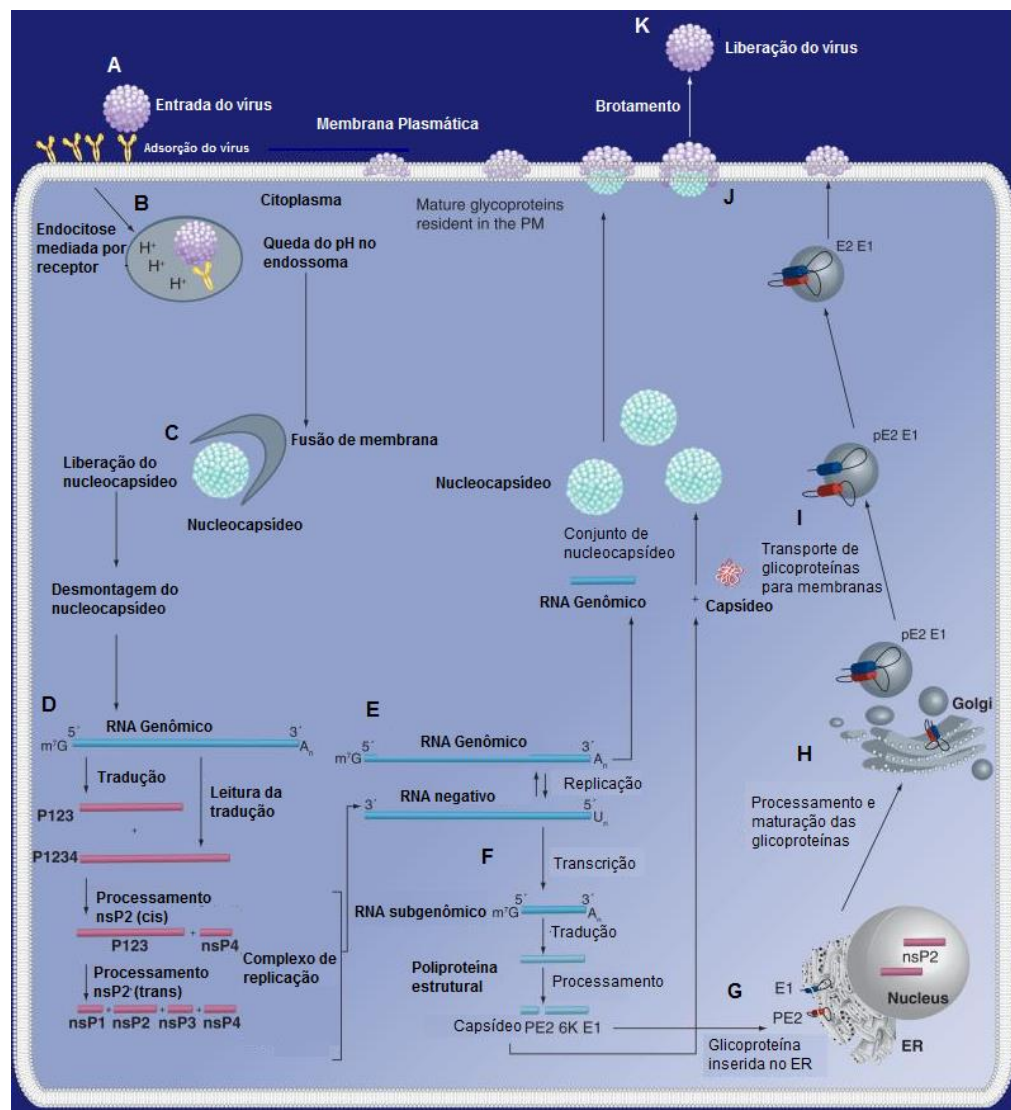
As proteínas não estruturais, responsáveis pela replicação, são inicialmente traduzidas a partir do RNA viral genômico. A maioria dos *alphavirus* produz poliproteína diferentes a P123 ou P1234. As poliproteínas sintetizadas sofrem a ação de proteases codificadas pelo vírus, a partir da proteína não estrutural (nsP2). As proteínas de replicação são traduzidas e processadas, permitindo a replicação do RNA genômico e a síntese das proteínas estruturais a partir da tradução do mRNA subgenômico. As glicoproteínas produzidas são translocadas através de retículo endoplasmático, processadas e transportadas através do aparelho de Golgi para as membranas plasmáticas. A montagem citoplasmática do RNA genômico e do capsídeo produz o nucleocapsídeo, que se associam as glicoproteínas processadas na membrana plasmática, resultando no brotamento do vírus (Figura 5) (JOSE; SNYDER; KUHN, 2010).

1.1.2.1. Vírus chikungunya

O vírus chikungunya (CHIKV) é um alphavirus responsável por causar artralgia em humanos. Foi isolado pela primeira vez em 1952 de um paciente febril, durante uma epidemia no Planalto de Makonde na Província Meridional da Tanzânia (ROBINSON, 1955). Possui três genótipos distintos baseados principalmente em suas origens geográficas: o genótipo da África Ocidental, o genótipo Leste/Centro/Sul da África (ECSA) e o genótipo Asiático (POWERS *et al.*, 2000).

O CHIKV é transmitido pelas espécies dos mosquitos *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti*. Entretanto, foi demonstrado que a mutação E1-A226V na glicoproteína E1 do envelope, onde se tem a substituição de uma alanina para uma valina na posição 226, identificada entre os isolados virais obtidos durante um surto (SCHUFFENECKER *et al.*, 2006), aumenta a capacidade de diferentes cepas de CHIKV infectar os mosquitos *Aedes albopictus* (TSETSARKIN *et al.*, 2007).

Figura 5: Ciclo de Replicação do *Alphavirus*



Legenda: A. Ligação do vírus ao receptor celular. B. Endocitose mediada por receptor. C. Liberação do nucleocapsídeo. D. Tradução e processamento das proteínas de replicação. E. Replicação do RNA genômico. F. Tradução do RNA subgenômico. G. Glicoproteínas inseridas no retículo endoplasmático (ER). H. Processamento e maturação das glicoproteínas. I. Transporte das glicoproteínas para membranas. J. Brotamento e liberação do vírus. Fonte: Adaptado de JOSE; SNYDER; KUHN, 2010.

A possibilidade de epidemias por CHIKV no Brasil é bem provável, pois a região possui características que facilitam a instalação do vírus, como a infestação dos dois vetores de CHIKV na região *Ae.aegypti* e *Ae.albopictus*. As infecções por DENV e CHIKV apresentam sintomas semelhantes dificultando o diagnóstico e o tratamento das doenças, além do mais os casos de infecções por CHIKV sintomáticos são superiores aos do DENV. A disseminação do vírus no território brasileiro é garantida pela suscetibilidade de toda população humana e o fato da região ser rica em espécies de primatas e culicídeos nunca expostas ao CHIKV, oferecendo condições ideais para o estabelecimento do ciclo silvestre, que até o momento só foi relatado na África (HONÓRIO *et al.*, 2015).

No Brasil, em 13 de setembro de 2014, foram confirmados os primeiros casos autóctones de CHIKV em Oiapoque, estado do Amapá. Após sete dias, casos autóctones também foram confirmados em Feira de Santana no estado da Bahia. Em 18 de outubro de 2014, tinham sido confirmados 682 casos autóctones notificados ao Ministério da Saúde (NUNES *et al.*, 2015). Em 2015, foram confirmados 13.236 (34,5%) casos de CHIKV e em 2016 confirmou-se 146.914 casos de CHIKV com 159 óbitos confirmados por febre de Chikungunya (SVS-MS, 2017a). Até a 15ª Semana epidemiológica (1/1/2017 – 15/4/2017) se têm registrado 43.010 casos prováveis de febre de chikungunya no país.

O CHIKV ao ser introduzido na pele pelo mosquito vetor, se replica nos fibroblastos, dissemina para o fígado, músculo, articulações, tecido linfóide (gânglios linfáticos e baço) e cérebro (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). As manifestações clínicas da doença causada por CHIKV coincidem com a elevação de mediadores imunológicos seguidos pela infiltração de células imunes em articulações infectadas e tecidos circundantes (BURT *et al.*, 2017; REDDY *et al.*, 2014). Os principais sintomas desencadeados são febre alta, artralgia grave, mialgia seguida de dores de cabeça, fotofobia e erupções cutâneas, com o período de incubação na média de 2 a 4 dias (BURT *et al.*, 2012).

1.1.2.2. Vírus Mayaro

O vírus Mayaro (MAYV) é um *alphavirus* isolado pela primeira vez em 1954 a partir de trabalhadores de florestas em Trindad (ANDERSON *et al.*, 1957). As primeiras epidemias de MAYV foram descritas no Brasil e na Bolívia, sendo endêmico em outros países da América do Sul (TOIVANEN, 2008). É transmitido por mosquitos *Haemagogus* que se localizam em

ambientes rurais e em copas de árvores, o que justifica a escassez de casos e as endemias em locais restritos (HALSEY *et al.*, 2013). Entretanto, a competência vetorial de *Aedes aegypti* foi demonstrada em laboratório sugerindo potencial transmissão urbana (LONG *et al.*, 2011).

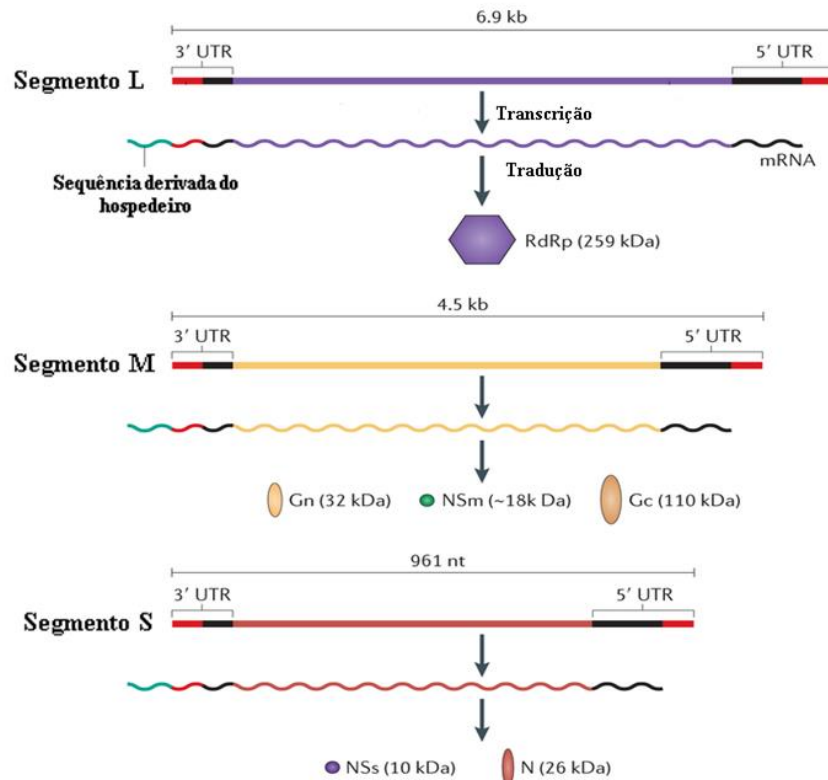
Surtos de infecções por MAYV em humanos podem ocorrer quando aves ou vetores introduzem o vírus nas zonas rurais com abundância de *Haemagogus* e potenciais reservatórios (DE THOISY *et al.*, 2003). A infecção por MAYV é caracterizada por artralgia intensa, principalmente nos tornozelos, pulsos e dedos dos pés, entretanto podem afetar articulações maiores, causam uma febre aguda leve à moderadamente grave, com duração de aproximadamente 3-5 dias (AZEVEDO *et al.*, 2009).

1.1.3. *Orthobunyavirus*

O *Orthobunyavirus* é o maior e mais complexo gênero da família *Bunyaviridae*. Constituído por 170 vírus agrupados em 48 espécies e em 18 sorogrupos antigênicos (GAUCI *et al.*, 2015). Os vírus da família *Bunyaviridae* (*Orthobunyavirus*) são vírus envelopados, esféricos de aproximadamente 90 nm de diâmetro (ELLIOTT, 2014).

Possuem três segmentos de RNA linear (pequeno, médio e grande) de cadeia simples e polaridade negativa. O segmento pequeno (S) codifica proteínas do nucleocapsídeo e em vírus de vários gêneros também codifica a proteína não estrutural (NSs). O segmento médio (M) codifica uma poliproteína que após processamento proteolítico gera as poliproteínas de superfície (Gn e Gc) e em alguns gêneros também a proteína não estrutural (NSm). O segmento grande (L) sintetiza a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp ou proteína L), que além de atividade de polimerase possui endonucleases que clivam o RNA mensageiro celular produzindo iniciadores “capped” que serão utilizados na transcrição do RNA mensageiro viral (Figura 6) (BRIESE; CALISHER; HIGGS, 2013).

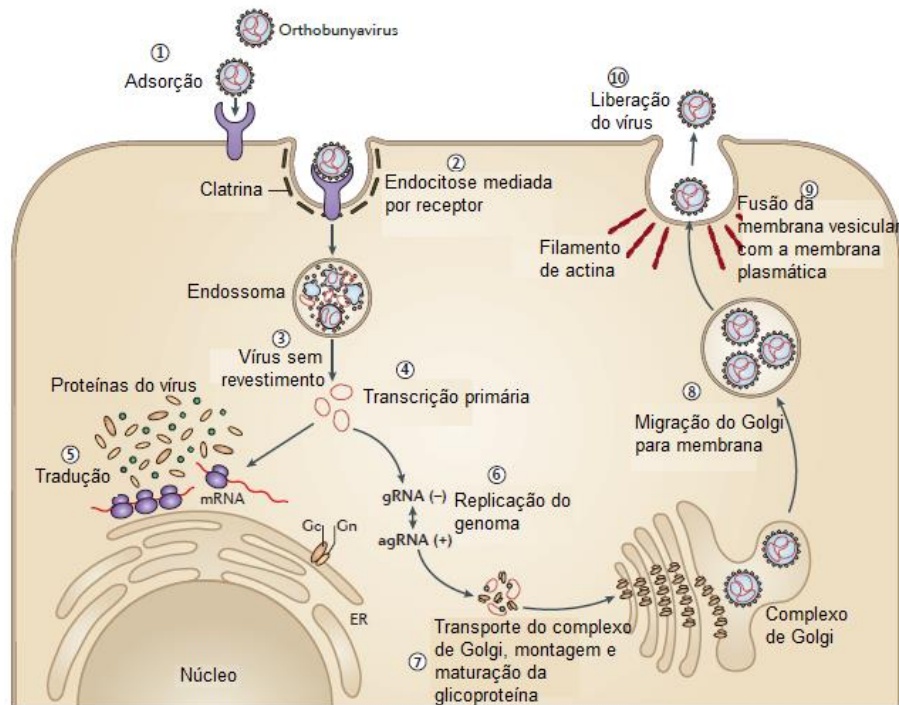
A replicação do *Orthobunyavirus* inicia com a ligação do vírus aos receptores de superfícies celulares através de uma ou ambas glicoproteínas virais (Gn/Gc), em seguida, o vírus é internalizado através de endocitose mediada por receptor. A acidificação da vesícula endocítica possibilita a liberação do virion e fusão da membrana viral com a membrana endocítica. Com a liberação da ribonucleoproteína (RNPs) no citoplasma, a RNA polimerase dependente de RNA viral catalisa a transcrição primária de mRNA virais, através de iniciadores derivados da célula hospedeira (ELLIOTT, 2014).

FIGURA 6 – Estratégia de codificação do genoma do Orthobonyavírus

Fonte: Adaptado de ELLIOTT, 2014.

Após a tradução dos mRNA virais, as glicoproteínas Gn e Gc são dimerizadas no retículo endoplasmático (ER) e acumulam no complexo de Golgi, onde irá ocorrer a montagem da partícula viral. Os três segmentos do genoma viral de sentido negativo (RNA genômico – gRNA) são convertidos em antígenomas de sentido positivo (RNA antígenômico – agRNA) para replicação do genoma viral. As ribonucleoproteínas virais são transportadas para regiões da membrana do Golgi que foram modificadas pela inserção das proteínas Gn e Gc, o que promove o brotamento de partículas virais em vesículas derivadas das membranas do Golgi. As vesículas do Golgi que contém o virion são transportadas para a superfície celular e a fusão das membranas vesiculares com a membrana plasmática, conduz a liberação do vírus infeccioso (Figura7) (ELLIOTT, 2014).

Figura 7: Ciclo de replicação de *Orthobunyavirus*



Legenda: 1. Adsorção do vírus. 2. Vírus internalizado por endocitose mediada por receptor. 3. Acidificação da vesícula endocítica possibilita o não revestimento viral. 4. Após liberação da ribonucleoproteína, ocorre a transcrição primária dos mRNA virais. 5. Tradução do mRNA viral. 6. Replicação do genoma viral, convertendo o RNA genômico (gRNA) em RNA antígeno (agRNA). 7. Transporte das ribonucleoproteínas para as membranas do Golgi, que modificadas pela inserção da Gn e Gc, promovendo o brotamento dos vírus. 8. Migração das vesículas do Golgi para membrana. 9. Fusão da vesícula do Golgi com a membrana plasmática. 10. Liberação do vírus. Fonte: Adaptado de ELLIOTT, 2014.

Aproximadamente 30 *Orthobunyavirus* são responsáveis por causar doenças em seres humanos, como por exemplo, o vírus Oropouche (OROV) que causa febre alta, o vírus de encefalite da Califórnia (CEV) que causa encefalite e o vírus Bunyamwera (BUNV) as febres hemorrágicas (ELLIOTT, 2014). No Brasil somente o OROV é reconhecido por circular em humanos, sendo o mais frequente *Orthobunyavirus* na região Amazônica (CARDOSO *et al.*, 2015).

1.1.3.1. Vírus Oropouche

O vírus Oropouche foi isolado pela primeira vez em um trabalhador febril em Trinidad em 1955 (ANDERSON *et al.*, 1961). No Brasil, o vírus foi descrito pela primeira vez em 1960, quando foi isolado de uma preguiça (*Bradypus tridactylus*) capturada na rodovia Belém-Brasília (VASCONCELOS *et al.*, 1989). O OROV é mantido na natureza por meio do ciclo silvestre que têm como hospedeiros amplificadores 95 espécies de aves silvestres, macacos e preguiças e como

vetores *Aedes serratus*, *Coquilletidia* spp. e *Culicoides* spp. Em relação às epidemias, o ciclo urbano costuma ocorrer durante período chuvoso, tendo o homem como reservatório e os *Culicoides paraensis* como vetores (CARDOSO *et al.*, 2015; TADEU; FIGUEIREDO, 1999; VASCONCELOS ' *et al.*, 1992).

A febre de Oropouche tem como sintomas comuns a febre, cefaleias, mialgias, artralgia, anorexia, tonturas, calafrios e fotofobia (FIGUEIREDO, 1999). É provável que a infecção por OROV e outros *Orthobunyavirus* no Brasil, seja subestimada por ser confundida com o vírus dengue em razão de apresentarem sintomatologia semelhante (CARDOSO *et al.*, 2015).

1.2. CICLO DE TRANSMISSÃO DE ARBOVÍRUS

A manutenção dos arbovírus na natureza ocorre através da transmissão biológica de arbovírus, constituída por três componentes essenciais: os vírus, os vetores e os vertebrados suscetíveis (KUNO & CHANG, 2005).

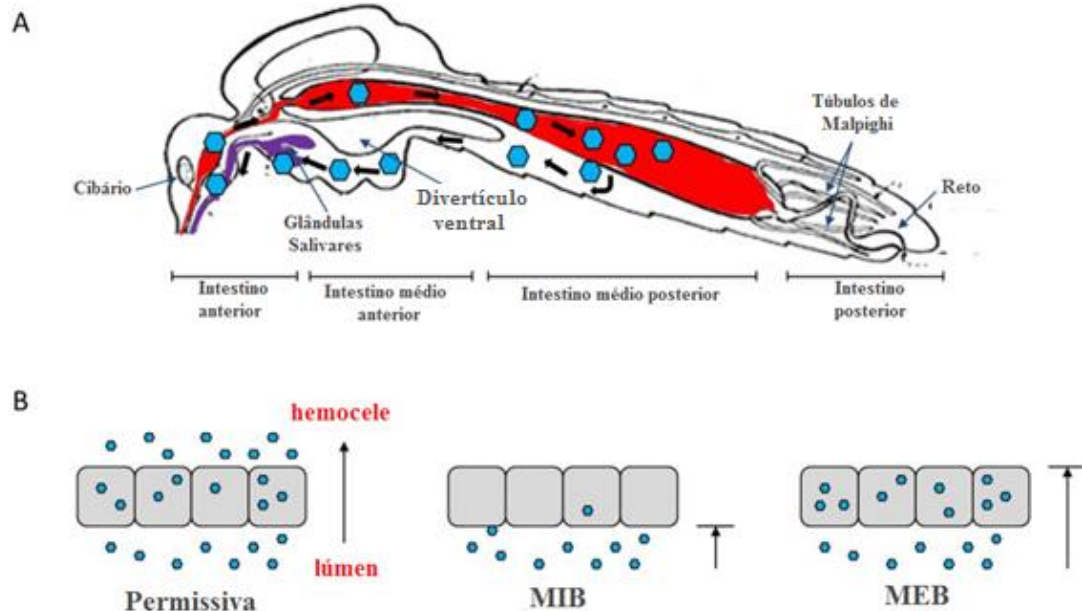
A transmissão biológica pode ser vertical que ocorre quando há a transmissão do vírus pelo vetor infectado aos seus descendentes. E a transmissão horizontal pode ser venérea quando o macho verticalmente infectado transmite o arbovírus à fêmea durante o acasalamento, ou por via oral quando o vetor infectado transmite o vírus ao hospedeiro vertebrado através da saliva durante o repasto sanguíneo (WEAVER; REISEN, 2010).

Para a maioria dos arbovírus, a transmissão horizontal por via oral é a mais comum. O vetor adquire o vírus durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, iniciando a infecção no intestino médio do vetor com posterior propagação para o epitélio do intestino médio, o vírus dissemina do intestino médio para os tecidos secundários ocorrendo à amplificação viral em vários tecidos fora do intestino médio e em seguida as glândulas salivares são infectadas (às vezes ocorre infecção nos tecidos reprodutivos para transmissão vertical aos seus descendentes) e finalmente o vírus é liberado nos canais salivares com transmissão horizontal a um hospedeiro vertebrado não infectado (Figura 8) (FRANZ *et al.*, 2015).

Quanto o inseto está infectado por um arbovírus, a infecção pode persistir em seus tecidos, podendo o inseto infectado transmitir o vírus ao longo de toda sua vida. O intervalo entre a aquisição de um agente infeccioso por um vetor e a capacidade do vetor transmitir o agente a outros hospedeiros vertebrados suscetíveis, denominado o período de incubação extrínseca, é um índice representativo da cinética e tropismo da disseminação do vírus em seu vetor. A duração do

período de incubação extrínseco varia consideravelmente de acordo com diferentes arbovírus, espécies de mosquitos e suas combinações (MILLER; MITCHELL; BALLINGER, 1989).

FIGURA 8 – Infecção do mosquito vetor por arbovírus e barreiras teciduais



Legenda: Representação esquemática do tropismo de arbovírus no mosquito vetor. **(B)** Representação esquemática de uma infecção do intestino médio permissiva, barreira de infecção do intestino médio (MIB) e fuga da barreira do intestino médio (MEB). Hexágonos azuis representam os virions, os quadrados cinza representam as células epiteliais do intestino médio. Fonte: Adaptado de FRANZ et al., 2015.

O período de incubação intrínseco caracteriza-se pelo tempo entre um ser humano infectado e o aparecimento dos sintomas devido à infecção. Nos seres humanos o período intrínseco apresenta dois períodos: a PII, que marca o início dos sintomas e o período de latência, que é o período entre a infecção e o aparecimento da infecciosidade (CHAN, M.; JOHANSSON, 2012).

1.3. EMERGÊNCIA DE ARBOVÍRUS

O surgimento de doenças arbovirais provavelmente ocorre devido ao aumento na distribuição geográfica dos vetores e dos vírus. A disseminação de um arbovírus necessita inicialmente da invasão do vetor ou da disponibilidade de vetores nativos adequados, seguido pelo transporte de arbovírus por dispersão do vetor ou do hospedeiro, além de ter hospedeiros vertebrados que desenvolvam título de viremia suficiente para infectar o vetor artrópode, assim,

como condições climáticas satisfatória no momento da introdução do vírus em determinado local, estabelecendo dessa forma a transmissão biológica do arbovírus (MARCONDES; CONTIGIANI; GLEISER, 2017).

Nas últimas décadas, diversos arbovírus emergiram e/ou reemergiram em países do Novo Mundo. Vírus que antes eram restritos a regiões da África e talvez da Ásia, como o ZIKV e o CHIKV, invadiram novos continentes causando grandes transtornos na saúde pública. Enquanto, alguns vírus permanecem gerando surtos, como o vírus da dengue, que registra milhões de casos por ano, em quase todos os países. O vírus do Nilo Ocidental rapidamente se disseminou na América do Norte e recentemente registrou-se novos casos na América Central e na América do Sul. Além de arbovírus que foram encontrados em novas regiões como o vírus Mayaro e o vírus da encefalite equina Oriental (MARCONDES; CONTIGIANI; GLEISER, 2017).

Os principais fatores que podem explicar essa emergência ou ressurgimento de doenças arbovirais, consistem no crescimento populacional desordenado, o aumento de viagens humanas e do comércio mundial. A expansão da urbanização aumenta a disponibilidade de hospedeiros suscetíveis, os quais frequentemente vivem em condições socioeconômicas precárias, o que facilita a expansão populacional do vetor e a transmissão de arbovírus (WEAVER; REISEN, 2010).

Além disso, a presença de um vírus endêmico pode aumentar e facilitar a infecção por um vírus recentemente introduzido. Essa teoria se baseia, em uma das características da infecção pelo DENV, que após uma infecção pelo DENV adquire-se imunidade ao sorotipo o qual causou a infecção, porém, não se tem imunidade aos demais sorotipos, sendo essa teoria utilizada para explicar um quadro grave da dengue que é a febre hemorrágica, a qual ocorre mais comumente após uma infecção secundária do que primária, sendo assim, a provável justificativa para a rápida disseminação do ZIKV em toda a América do Sul e no Caribe, gerando uma doença mais grave, se deve à ampla exposição prévia (ou concorrente) ao DENV (DEJNIRATTISAI *et al.*, 2016; MARCONDES; CONTIGIANI; GLEISER, 2017).

A capacidade de alguns arbovírus como o CHIKV, DENV, ZIKV e o YFV em participar de um ciclo de transmissão urbana consiste na utilização de vetores altamente eficientes e antropofílicos como o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*, ou ciclos peridomésticos enzoóticos envolvendo aves urbanas e mosquitos do gênero *Culex*. Portanto, esses fatores podem estar relacionados com o surto de arbovírus emergentes e re-emergentes (WEAVER; REISEN, 2010).

1.4. VETORES DE ARBOVÍRUS

Atualmente aproximadamente 300 tipos de mosquitos podem transmitir arbovírus, sendo *Aedes* spp e *Culex* spp os principais vetores de importância médica em seres humanos. Além disso, 25 espécies de ceratopogonídeos são descritas por transmitirem arbovírus, principalmente os gêneros *Culicoides* (24 espécies) e *Losiohelea*. Os carrapatos também, 116 espécies diferentes, são vetores predominantes de arbovírus. Além dos flebotomíneos, borrachudos, percevejos, piolhos e ácaros que também são conhecidos por transmitir arbovírus. Sendo assim, essa diversidade de espécies e a ampla distribuição desses vetores explicam o fato dos arbovírus serem extremamente bem sucedidos em dispersar-se globalmente (CONWAY; COLPITTS; FIKRIG, 2014; LIANG; GAO; GOULD, 2015).

Os fatores genéticos e ecológicos estabelecem os limites para a escolha do hospedeiro vertebrado pelo vetor, porém, o comportamento oportunista dos vetores modifica com frequência de seleção do hospedeiro, sendo esta influenciada pela disponibilidade de hospedeiros vertebrados em determinado local (KUNO; CHANG, 2005).

Os mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* são responsáveis pela transmissão de diversos arbovírus no mundo. O DENV, CHIKV e ZIKV, apesar de provavelmente terem surgidos como zoonoses, tomam os seres humanos como seus principais hospedeiros de amplificação, particularmente em ambiente urbano (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016; WANG *et al.*, 2000).

1.4.1. Culicídeos

Os mosquitos são insetos de pequeno porte e corpo delgado, comumente conhecido por muriçocas, carapanãs e pernilongos. Pertencentes à ordem Diptera, subordem Nematocera e família Culicidae. A família Culicidae possui 3.555 espécies descritas e estão agrupadas em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; HARBACH, 2013).

A subfamília Anophelinae possui 482 espécies formalmente reconhecidas agrupadas em três gêneros: *Anopheles*, cosmopolita; *Chagasia*, restrita a região neotropical, e *Bironella*, existente apenas na região australiana. Os Culicinae compreendem a maior subfamília de mosquitos, contendo 3.067 espécies em 109 gêneros agrupados em 11 tribos. A tribo Aedini é a

maior dentro dos Culicinae, com 1.261 espécies, tendo em sua classificação tradicional apenas 11 gêneros reconhecidos (Tabela 1), os demais são considerados subgêneros dentro do gênero polifilético *Aedes* (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; HARBACH, 2013; WILKERSON *et al.*, 2015).

Os mosquitos são holometabólicos, com metamorfose completa. Portanto, apresentam quatro estágios de desenvolvimento, ovo, larva, pupa e adultos. Os três primeiros são formas imaturas que se desenvolvem em meios aquáticos e a forma adulta em meio terrestre (Figura 9) (FORATTINI, 2002). A duração de cada uma das fases e estágio varia conforme as condições microclimáticas e da disponibilidade de alimentos (ALMEIDA, 2011).

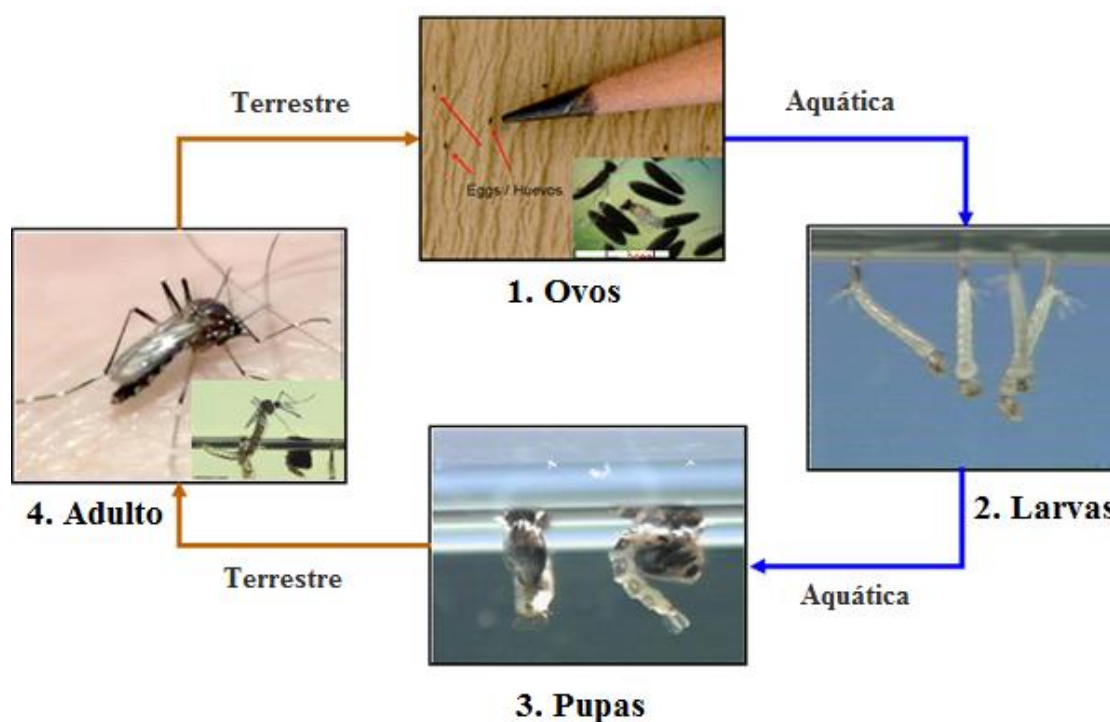
TABELA 1: Classificação da família Culicidae (Diptera)

Subfamília	Tribo	Gênero
Anophelinae		<i>Anopheles</i>
		<i>Bironella</i>
		<i>Chagasia</i>
Culicinae	Aedeomyiini	<i>Aedomyia</i>
	Aedini	<i>Aedes</i>
		<i>Armigeres</i>
		<i>Eretmapodites</i>
		<i>Haemagogus</i>
		<i>Heizmannia</i>
		<i>Ochlerotatus</i>
		<i>Opifex</i>
		<i>Psorophora</i>
		<i>Udaya</i>
		<i>Zeugomyia</i>
	Culicini	<i>Culex</i>
		<i>Deinocerites</i>
		<i>Galindomyia</i>
		<i>Lutzia</i>
	Culisetini	<i>Culiseta</i>
	Ficalbiini	<i>Ficalbia</i>
		<i>Mimomyia</i>
	Hodgesiini	<i>Hodgesia</i>
	Mansoniini	<i>Coquillettidia</i>
		<i>Mansonia</i>
	Orthopodomyiini	<i>Orthopodomyia</i>
	Sabethini	<i>Isostomyia</i>
		<i>Johnbelkinia</i>
		<i>Kimia</i>
		<i>Limatus</i>
		<i>Malaya</i>

	<i>Maorigoeldia</i>
	<i>Phoniomyia</i>
	<i>Sabethes</i>
	<i>Shannoniana</i>
	<i>Topomyia</i>
	<i>Trichoprosopon</i>
	<i>Tripteroides</i>
	<i>Wyeomyia</i>
Toxorhynchitini	<i>Toxorhynchites</i>
Uranotaeniini	<i>Uranotaenia</i>

Fonte: HARBACH, 2013.

FIGURA 9: Ciclo de vida dos mosquitos



Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2012.

As fêmeas depositam seus ovos diretamente na água ou em locais que são possivelmente inundados. Após a eclosão dos ovos, inicia-se a fase larvária que compreende quatro estádios que são essencialmente aquáticos de vida livre e possuem grande mobilidade (FORATTINI, 2002). Na fase pupa ocorre a metamorfose no mosquito, durante a qual não se alimentam e se encontram

em grande atividade de divisão celular para formar o mosquito adulto (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Os mosquitos adultos são alados e movimentam-se com grande facilidade (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Após emergirem as formas adultas procuram abrigos, onde possam manter-se em repouso até iniciar as suas atividades, nesses abrigos durante algumas horas ocorre o endurecimento do tegumento corporal, necessário para se realizar a cópula ou acasalamento, que consiste da união sexual do mosquito fêmea e o macho, normalmente a cópula ocorre em pleno voo, sendo assim a maioria dos culicídeos são eurígamos ou eurigâmicos, ou seja, necessitam que as fêmeas sejam atraídas para um enxame de machos, que podem ser de diferentes espécies. Apesar de poder ocorrer cópulas entre indivíduos de espécies diferentes, acredita-se que o reconhecimento da própria espécie se faça através da ação de feromônios. Porém, algumas espécies são estenógamas ou estenogâmicas, sendo capazes de copular em ambientes confinados durante o voo ou em repouso sobre uma superfície (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

A maioria dos mosquitos machos e fêmeas, depende da ingestão dos carboidratos, frequentemente provenientes de líquidos vegetais, flores e frutos. O respasto sanguíneo é realizado apenas pelas fêmeas, devido o sangue dos vertebrados ser rico em aminoácidos, que são essenciais para a produção normal dos ovos, os quais não se desenvolveriam sem os produtos finais do metabolismo do sangue ingerido (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). A maioria das espécies se alimentam de animais de sangue quente, porém, muitas espécies também se alimentam de animais de sangue frio como cobras, tartarugas e sapos (HARBACH, 2007).

Os mosquitos são encontrados em locais onde o ar é relativamente frio e a umidade alta. Quanto a distribuição vertical desses mosquitos geralmente está relacionada aos hábitos alimentares (HARBACH, 2007). No ambiente exófilo das florestas, observou-se que algumas espécies de culicídeos preferem exercer suas atividades nas copas das árvores, apresentando acrodendrofilia, como os representantes do gênero *Phoniomyia* e *Sabethes*. Porém, espécies dos gêneros *Aedes* e *Psorophora*, têm preferências por níveis próximos ao solo. Também há culicídeos que são indiferentes quanto as altitudes arbóreas para desenvolverem suas atividades (FORATTINI, 2002).

1.4.1.1. Identificação Taxonômica

A identificação das espécies de Culicidae é realizada predominantemente através da análise das características morfológicas próprias da espécie (FORATTINI, 2002). Os mosquitos são insetos finos e de pernas longas, com uma longa probóscide e escamas na maior parte do seu corpo, o que facilita o seu reconhecimento. A diferença das larvas para os demais insetos aquáticos consiste na presença de cerdas e antenas na cabeça, um tórax, em forma de bulbo, mais longo que a cabeça e o abdômen, papilas anais posteriores e um par de aberturas respiratórias na subfamília Anophelinae ou um sifão respiratório alongado próximo a extremidade do abdômen na subfamília Culicinae (HARBACH, 2007).

O sexo dos mosquitos, pode ser determinado a partir das características da porção flagelar da antena, nos machos os pelos implantados nos segmentos são mais numerosos e longos do que nas fêmeas, além disso nos machos os pêlos encontram-se inseridos na porção subapical e nas fêmeas na porção basal. Dessa forma, as antenas das fêmeas são denominadas pilosas e dos machos plumosas (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

As principais características morfológicas para identificação das espécies da subfamília Culicinae consistem dos adultos possuírem a margem superior do escutelo trilobada em ambos os sexos, os palpos das fêmeas são curtos, muito menores que a probóscide, os ovos são desprovidos de flutuadores e as larvas possuem os espiráculos implantados na extremidade de um sifão, que pode ser classificado de bem curto a muito longo (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

A tribo Culicini pertencente a subfamília Culicinae é constituída por 795 espécies agrupadas em quatro gêneros: *Culex* Linnaeus (cosmopolita) *Deinocerites* Theobald (Neotropical), *Galindomyia* Stone e Barreto (Neotropical) e *Lutzia* Theobald (ausente nas regiões Polioártica e Neoártica Oeste), estes agrupam espécies muito variáveis, tanto em relação à biologia quanto as características morfológicas (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; HARBACH, 2011).

O gênero *Culex*, possui 768 espécies subdivididas em 26 subgêneros, destes 14 estão presentes na região Neotropical, *Allimanta*, *Belkinomyia*, *Culex*, *Microculex*, *Carrollia*, *Phenacomysia*, *Phytotelmatomyia*, *Melanoconion*, *Micraedes*, *Anoedioparpa*, *Aedinus*, *Neoculex*, *Nicaromyia*, e *Tinolestes* (HARBACH, 2011). Os principais subgêneros *Melanoconion* Theobald e *Culex* Linnaeus (FORATTINI, 2002). Dentre os gêneros pertencentes à família Culicidae, o

Culex spp. é um dos principais, e apesar disso há escassez das informações quanto à taxonomia e às relações filogenéticas dentro deste gênero são desconhecidas (MILLER; CRABTREE; SAVAGE, 1996).

Apenas uma pequena fração das fêmeas do gênero *Culex* possuem características específicas e com baixa variabilidade, o que dificulta a identificação dessas espécies coletadas na fase adulto e em fêmeas. Entretanto, a genitália masculina dos *Culex* spp. possui características marcantes, sendo a melhor forma de identificação dos mesmos (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; HARBACH, 2011). Dessa forma, a identificação de espécies a partir de características morfológicas das fêmeas é difícil, sendo necessário examinar caracteres das genitálias masculinas e estágios imaturos do mosquito, além do que as condições de manipulação e amostragem dos espécimes no campo, influenciam diretamente a identificação das espécies, pois, geralmente os espécimes sofrem danos, durante o seu transporte ao laboratório, o que impede uma identificação confiável pelos taxonomistas (DEMARI-SILVA *et al.*, 2011; TORRES-GUTIERREZ *et al.*, 2016).

Algumas espécies do gênero *Culex* são vetores de diferentes patógenos humanos como a filariose linfática, como o vírus da encefalite de Sant Louis e da encefalite equina (KASAI *et al.*, 2008), portanto, a identificação de suas espécies é essencial para o controle desses vetores. Sabe-se que a identificação de espécies através de características morfológicas apresenta limitações, não apenas das espécies do gênero *Culex* (HEBERT *et al.*, 2003). Sendo assim, técnicas de identificação microgenômica, o qual permite determinar e descobrir novas espécies através da análise de um pequeno segmento do genoma, representa uma abordagem eficiente e que facilitaria o diagnóstico da diversidade biológica (HEBERT *et al.*, 2003).

1.4.1.1.1. Identificação biológica através do DNA Barcode

O DNA *Barcode* é um método genômico utilizado para identificar organismos através da análise das variações entre sequências de DNA, foi assim denominado, pois, sequências desse DNA seriam como um código de barra genético presente em cada célula. A fundamentação é similar aos códigos de barras universais utilizados para varejo, que utilizam 10 algarismos alternativos em 11 posições para gerar 100 bilhões de identificadores únicos (HEBERT *et al.*, 2003).

Em relação ao DNA *Barcode* ou código de barra genômico se tem disponível apenas quatro nucleotídeos alternados (adenina, citosina, guanina e timina) em cada posição, porém, a disponibilidade de sítios é bem maior que 11 posições, sendo assim, a conservação de apenas 15 nucleotídeos criaria possivelmente 1 bilhão de códigos únicos, o que permitiria que cada táxon apresentasse uma sequência única de DNA *Barcode* possibilitando sua identificação (HEBERT *et al.*, 2003).

Como proposta inicial do DNA *Barcode*, está sendo gerado um banco de dados com sequências de DNA padronizada do genoma para todas as espécies existentes. Para o Reino Animalia a região de DNA escolhida foi a subunidade I do gene mitocondrial citocromo c oxidase - COI, devido este gene ser amplamente distribuído entre os animais, apresenta milhares de cópias por célula, as taxas de mutações são variáveis entre as espécies, a exposição a recombinação é limitada e possui modelo de herança estritamente materna (HEBERT *et al.*, 2003; TAYLOR; TURNBULL, 2005).

A identificação de espécies por DNA *Barcode* é útil e eficaz, uma vez que, as divergências de sequências de DNA intraespecífica, ou seja, entre indivíduos da mesma espécie é muito menor, do que a divergência interespecífica, entre indivíduos de diferentes espécies (HEBERT *et al.*, 2004). O *The Barcode of Life Data System* (BOLD), banco de dados do DNA *Barcode*, é uma plataforma integrada de bioinformática que abrange todos os passos da fase analítica desde a coleta de espécimes até a biblioteca de códigos de barras validados, auxiliando na aquisição, armazenamento, análise e publicação de registros dos códigos de barra do DNA (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

Para que haja o registro de um espécime no BOLD com status de código de barra formal, é necessário: (1) determinar o nome da espécie; (2) comprovantes dos dados como número do catálogo e armazenamento na instituição; (3) os registros da coleta como o coletor, a data da coleta e o local com coordenadas geográficas registradas no GPS; (4) determinar o responsável pela identificação do espécime; (5) sequência do COI com pelo menos 500 pares de bases (pb); (6) iniciadores utilizados na reação em cadeia da polimerase e (7) os arquivos de rastreamento (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). A base de dados COI pode servir como um sistema de bioidentificação para animais, o qual supera as limitações da identificação morfológica, quantificando os limites da diversidade intraespecífica, reconhecendo espécies irmãs e identificando as espécies em todos os estágios de vida (HEBERT *et al.*, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

Doenças transmitidas por vetores têm sido um grande desafio para a saúde pública, sendo os mosquitos os principais vetores de centenas de microrganismos em todo o mundo (CHENG *et al.*, 2016). As condições ecológicas e ambientais da floresta amazônica favorecem a presença abundante e diversificada de mosquitos, incluindo as espécies que são vetores potenciais de patógenos humanos (LAPORTA *et al.*, 2012). Os vírus emergente e re-emergentes transmitidos por artrópodes representam uma ameaça significativa para a saúde humana (COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014).

As arboviroses têm se tornado uma importante e constante ameaça, não apenas nas regiões tropicais, mas em todo o mundo, devido às alterações genéticas nos vírus, a facilidade de adaptação destes vírus a novos ambientes e hospedeiros, tanto os vertebrados como os invertebrados, ou por causa de fatores ambientais antropogênicos, como urbanização desorganizada, deslocamento populacional e precariedades do saneamento básico, que favorece a amplificação e transmissão desses vírus (DONALISIO *et al.*, 2017; LOPES; NOZAMA; LINHARES, 2014).

Ações desenvolvidas pelo homem em áreas florestais constituem risco evidente de contaminação por arbovírus uma vez que os animais e vetores são deslocados dos seus ambientes naturais e se mantêm próximos ao homem, processos de desmatamentos e construções de hidrelétricas, por exemplo, causam mudanças ecológicas no habitat natural dos arbovírus, alterando seu ciclo, podendo haver adaptação do vírus a novos reservatórios e, assim aumentar sua multiplicação e o risco de emergência (TADEU; FIGUEIREDO, 2007).

Portanto, estudos desenvolvidos em áreas florestais que sofreram diferentes graus de antropização podem contribuir para a determinação de potenciais vetores de arbovírus, além do que o surgimento e ressurgimento de arbovírus em toda a América do Sul enfatiza a importância de estudos sobre a fauna de mosquitos e sua infecção natural por arbovírus, assim como de ferramentas moleculares que facilitem a identificação e descoberta de espécies de mosquitos, pois, nenhuma espécie pode ser considerada como não importante, mesmo quando nunca tenha sido apontada como vetor de arbovírus (MARCONDES; CONTIGIANI; GLEISER, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a presença de infecção por arbovírus em mosquitos (Diptera: Culicidae) capturados em três áreas florestais do estado de Rondônia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detalhar as espécies e os gêneros de amostras selecionadas de culicíneos para inquérito virológico, em função do local de coleta;

- Utilizar a região 5' do gene COI como marcador molecular para identificação de morfotipos do gênero *Culex*;

- Identificar e caracterizar molecularmente arbovírus em mosquitos;

- Estimar as taxas de infecção de arbovírus associados aos culicíneos silvestres (Culicidae).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo é um subprojeto do trabalho de pesquisa titulado “Distribuição vertical de potenciais vetores envolvidos na transmissão da malária símia e de arboviroses em três localidades no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental, Brasil” o qual foi aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/MMA) sob o número 42353-2, foi executado com apoio financeiro da Chamada Universal - MCTI/CNPQ No.14/2013 (Processo: 477490/2013-1) e da Chamada Mudança de Titularidade Proj ED Universal 2013 por falecimento do Titular Prof Luiz Hildebrando (Processo: 400238/2015-2).

4.2. ÁREA DE ESTUDO

Neste estudo a captura dos insetos foi realizada em três áreas florestais: Santo Antônio – SA (8° 53' 7.10" S 64° 0' 55.90" W) e Sítio São Vicente – SV (9° 34' 58.50" S 64° 51' 57.50" W), regiões pertencentes ao município de Porto Velho e Floresta Nacional do Jamari – FN (9° 15' 35.20" S 62° 54' 13.3" W) localizada no município de Itapuã do Oeste. Estas áreas estão localizadas na porção setentrional do estado de Rondônia. Cada área foi demarcada utilizando o GPS Garmin - GPSMAP®64 (Figura10).

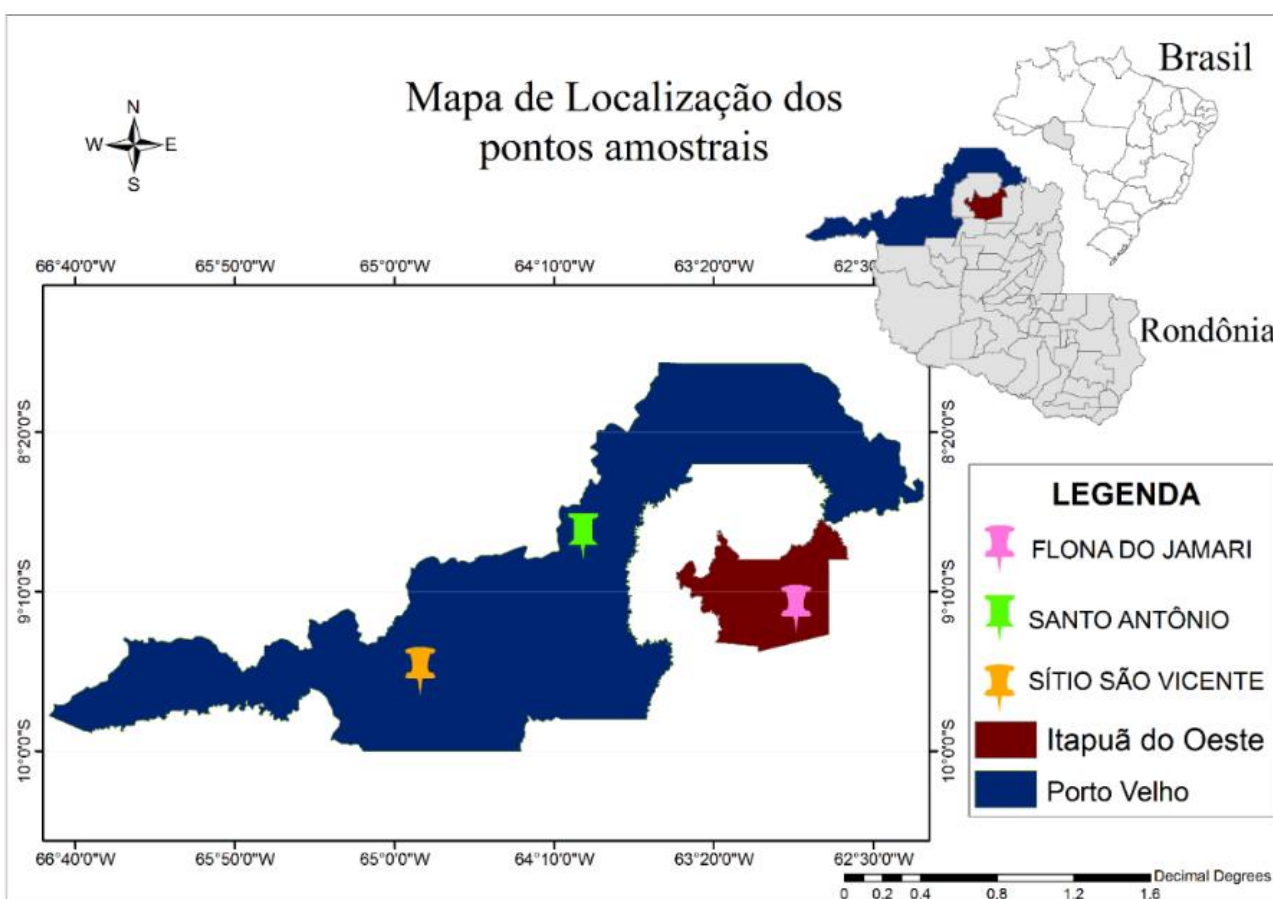
As localidades foram escolhidas, principalmente, devido à rica diversidade de vida animal, além das áreas localizadas no município de Porto Velho serem próximas a regiões que sofreram considerável impacto ambiental devido a construção de usinas hidrelétricas. A Floresta Nacional do Jamari que apesar de ter a maior parte da sua área destinada à preservação ambiental, possui 96 mil dos seus 220 mil hectares destinados a concessão florestal, onde é permitido a exploração da madeira, material lenhoso, residual de exploração, produtos não madeireiros, serviços de hospedagem e lazer (BRASIL, 2017).

4.3. CAPTURA DOS MOSQUITOS

Foram realizados quatro eventos de amostragem de culicídeos nas áreas de floresta, nos quais foram capturados 31.874 mosquitos (Diptera: Culicidae), sendo 3.975 exemplares da subfamília Anophelinae e 27.899 da subfamília Culicinae. Para o presente estudo, foram consideradas apenas três coletas de dípteros em cada área de estudo. Cada coleta foi realizada

durante três dias consecutivos. A primeira amostragem ocorreu na estação seca (26-29 de agosto de 2015, 01-07 e 14-17 de setembro de 2015) e a segunda e terceira amostragem na estação chuvosa (2ª Amostragem: 01-03, 07-09 e 13-17 de dezembro de 2015; 3ª Amostragem: 03-05, 10-12 e 17-19 de fevereiro de 2016). Os dados de riqueza e abundância de espécies referem-se apenas aos pools e indivíduos de mosquitos Culicinae selecionados para inquérito virológico (ver seção 4.6.1).

FIGURA 10 – Localização das áreas estabelecidas para as coletas entomológicas de potenciais vetores de arbovírus em Rondônia



Em cada área foram demarcados quatro pontos de coleta. No decorrer de cada evento (três noites) 16 armadilhas foram instaladas. Em cada ponto, quatro CDCs (desenvolvida pelo Centers for Disease Control) e quatro BG-Sentinela (Figura11) foram dispostas a cerca de 1 metro de altura do solo e o mesmo número em copas de árvores com 17 a 25 metros de altura. O tempo de captura foi de 12 horas, iniciando às 18 horas e finalizando às 6 horas do dia seguinte.

A armadilha CDC-luminosa (HP-Biomédica) foi descrita por Pugedo e colaboradores (2005). A armadilha BG-Sentinel® imita as correntes de convecção criadas pelo calor do corpo humano com um ventilador e imita odores humanos, utilizando como isca o CO₂ (FARAJOLLAHI *et al.*, 2009). Utilizou-se gelo seco contido em isopores cilíndricos como fonte de gás carbônico da BG-Sentinel.

FIGURA 11 - Armadilhas utilizadas para captura de insetos



Legenda: A= CDC-Luminosa B= BG-Sentinel®. Fotos: Antônio Marques

4.4. TRIAGEM E ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS

Os insetos capturados foram transferidos para recipientes e identificados segundo o local, data, ambiente de coleta e tipo de armadilha. Depois foram acondicionados em caixa de isopor, sendo transportados vivos. Na base de pesquisa próximo ao ambiente de coleta, foram identificados taxonomicamente por microscopia estereoscópica pela equipe de pesquisa conforme nomenclatura proposta por CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; LANE, 1953. Os insetos identificados foram estocados individualmente ou agrupados em pools (2-34 indivíduos) segundo categoria taxonômica, local e data de coleta. Somente os Culicinae foram incluídos neste estudo para identificação de arbovírus, sendo armazenados em solução RNA later (RNA Stabilization Reagent - Qiagen). Exemplares de Anophelinae foram destinados

à análise de detecção de *Plasmodium* constituindo outro estudo de mestrado. Em adicional a metodologia de DNA *Barcode* foi utilizada para identificar mosquitos do gênero *Culex*.

4.5. IDENTIFICAÇÃO POR DNA *BARCODE*

Os mosquitos do gênero *Culex* inicialmente identificados por característica morfológicas, classificados em espécies ou subgêneros ou grupos de morfotipos. Alguns exemplares que não foram selecionados para detecção de arbovírus, foram submetidos à identificação por DNA *Barcode*.

4.5.1. Extração do DNA

Para a extração do DNA utilizou-se o kit “*Purification of total DNA from insects using the DNeasy Blood & Tissue – Qiagen/USA*”. Utilizou-se as pernas dos mosquitos (DE SOUZA PINTO *et al.*, 2015) para extração do DNA. Para tal, as pernas dos mosquitos foram removidas e maceradas a temperatura ambiente (TA). Para o processo de maceração adicionou-se 180 µL de tampão ATL e 20 µL de Proteinase K em microtubo de 1,5 mL, misturou-se completamente por vórtex e incubou a 56°C por 3 horas, para que houvesse a lise completa do tecido. Em seguida, homogenizou-se em vórtex por 15 segundos, adicionou 200 µL de tampão AL e misturou completamente por vórtex. Posteriormente adicionou 200 µL de etanol (96 – 100%) e misturou novamente por vórtex. O conteúdo foi transferido para a coluna de filtragem e centrifugado à 8.000 rpm durante 1 minuto.

Após centrifugação o filtrado foi descartado e adicionou-se a coluna 500 µL do tampão de lavagem AW1 e centrifugado por 1 minuto à 8.000 rpm. Na sequência o filtrado foi descartado e adicionou-se a coluna 500 µL do tampão de lavagem AW2 e centrifugado por 3 minuto à 14.000 rpm. O filtrado foi descartado e a coluna submetida a uma nova centrifugação por 3 minuto a 14.000 rpm para secagem completa da membrana da coluna.

A coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, adicionando 100 µL do tampão de eluição AE, incubou a temperatura ambiente por 1 minuto, com posterior centrifugação a 8.000 rpm durante 1 minuto. No tubo de eluição continha o DNA extraído que era armazenado a 4°C para utilização imediata e - 20°C para armazenamento de longo prazo.

4.5.2. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR do gene COI

Para amplificação do gene mitocondrial citocromo C oxidase I, utilizou-se os iniciadores obtidos por levantamento bibliográfico LCO1490 (5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3') e HCO2198 (5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') que amplifica um fragmento de 658 pb do gene COI (HEBERT *et al.*, 2003).

A reação de amplificação foi realizada a partir de 5 µL de DNA (0,2 ng/ µL – 12,4 ng/ µL), 3 U de HotMaster™ Polimerase, tampão 10x contendo 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 35 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1Mm DTT, 50% Glicerol, 0,5 % Tween® 20, 0,05% Igepal ® CA-630, Mix de dNTP a 10 mM, 0,4 µM de cada iniciador e água pura para completar o volume de 25 µL. A reação foi incubada no termociclador Applied Biosystems, sob a ciclagem de 3 min a 95°C, 37 ciclos de 95°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min e 30 seg.

Para a detecção do produto amplificado na PCR, o mesmo foi aplicado em gel de agarose com percentual de 1,5% em tampão TAE 1X (Tampão Tris-Acetate - Tris 40mM, Ac. Acético 20mM, EDTA 1mM) na corrida. Para visualização do gel, o mesmo foi corado com GelRed 10X e submetido à luz ultravioleta.

4.5.3. Purificação do produto da PCR

Os produtos de PCR foram purificados utilizando kit “*PureLink Quick gel extraction*” (Invitrogen – LifeTechnologies) que purifica o fragmento de DNA diretamente do gel de agarose. Retirou-se uma área mínima contendo o fragmento de interesse da agarose. Adicionou 1,7 mL de tampão de solubilização (L3) no tubo com gel excisado. Colocou-se o tubo com o tampão L3 e o gel no banho a 50°C durante 10 minutos. Depois que o gel estava visivelmente dissolvido ficou incubado por mais 5 minutos. O gel dissolvido foi pipetado na coluna de extração, dentro de um tubo de lavagem. Centrifugou a coluna a 12.000 rpm por 1 minuto. O fluxo de passagem foi descartado e a coluna foi colocada em um tubo de lavagem, adicionou-se 500 µL de tampão de lavagem (W1) com etanol. Centrifugou a coluna a 12.000 rpm por 1 minuto. Descartou o fluxo de passagem e centrifugou a coluna por mais 2 minutos na velocidade máxima. A coluna foi colocada em um tubo limpo e adicionou-se 50 µL de tampão de eluição (E5) no centro da coluna. Incubou-se o tubo há 1 minuto em temperatura ambiente. Centrifugou a coluna a 12.000 rpm por

1 minuto. No tubo de eluição continha o DNA purificado que era armazenado a 4°C para utilização imediata ou a – 20°C para o armazenamento de longo prazo.

4.5.4. Sequenciamento e Análise das sequências

O sequenciamento foi realizado utilizando a técnica de Sanger, na plataforma de sequenciamento ABI 3130 da subunidade RPT01H - Sequenciamento de DNA – AM do Instituto Leônidas e Maria Deane, da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) Amazônia e na plataforma de Sequenciamento de DNA e Genotipagem (RPT01E) da RPT do PDTIS, localizada no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisa René Rachou.

A edição das sequências *sense* e *anti-sense* e o alinhamento múltiplo foram realizados utilizando o programa MEGA 7 - Molecular Evolutionary Genetics Analysis (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) e a obtenção da sequência consenso através do BioEdit 7.2.6. (HALL, 1999).

A similaridade das sequências consenso obtidas com as sequências depositadas no GenBank, foi verificada utilizando a ferramenta de alinhamento local BLASTn (NCBI). Utilizou-se a ferramenta BLASTx (NCBI) para consultar a proteína correspondente ao produto esperado da subunidade I do citocromo c oxidase. A porção gênica do estudo que corresponde a 520 pb de fragmento do gene COI da posição 1532 - 2052, foi verificada utilizando como referência o genoma completo das mitocôndrias de *Culex quinquefasciatus* disponível no GenBank (número de acesso: NC014574).

A composição média de nucleotídeos das sequências, o número de sítios variáveis e os sítios conservados, bem como a distância média intraespecífica pelo método evolutivo Kimura 2-parâmetro, foram determinados através do MEGA 7.

4.5.4.1. Delimitação das espécies

A delimitação das espécies foi estimada através do software *Automatic Barcode Gap Discovery* – ABGD, que classifica as sequências em espécies hipotéticas com base no *gap barcode*, o qual pode ser observado sempre que a divergência intraespecífica é menor que a divergência interespecífica (PUILLANDRE *et al.*, 2012).

4.5.4.2. Análise Filogenética

A árvore filogenética foi gerada utilizando sequências publicadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e Boldsystems (<http://www.boldsystems.org/>) pelo método de Neighbour-Joining, utilizado por ser um método robusto e confiável. A confiabilidade dos ramos resultantes foi obtida por *bootstrap*, método de reamostragem, utilizando 1.000 réplicas. As distâncias evolucionárias foram computadas utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2-parametros (KIMURA, 1980) no MEGA 7 - Molecular Evolutionary Genetics Analysis (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

4.6. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ARBOVÍRUS EM MOSQUITOS

4.6.1. Seleção de pools

Devido à grande quantidade de mosquitos e *pools* obtidos durante as coletas (24.396 indivíduos de Culicinae), critérios de seleção de *pools* foram estabelecidos para que as análises moleculares abrangessem a maioria dos gêneros de Culicinae: Todos os espécimes e pools de mosquitos de gêneros menos frequentes de Culicinae foram analisados (*Aedes*; *Uranotaenia*; *Psorophora*; *Orthopodomyia*; *Wyeomyia*, *Limatus*; *Sabethes*; *Haemagogus*). Os espécimes e pools de mosquitos dos gêneros mais abundantes *Culex*, *Mansonia*, *Aedeomyia* e o *Coquillettidia* foram selecionados em função de aspectos taxonômicos, priorizando aqueles que tiveram sua espécie identificada ou aqueles com morfotipagem completa. Os morfotipos foram estabelecidos apenas para o gênero *Culex* (durante a identificação em campo) e incluíam exemplares do subgênero *Culex* e *Melanoconion*.

4.6.2. Controle Positivo

As amostras de controle positivo utilizados nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs) foram de vírus isolados a partir do soro de humanos, gentilmente cedidos pela Fiocruz – Rio de Janeiro.

4.6.3. Extração do RNA viral

Para o processo de extração de RNA viral dos pools de mosquitos e controles positivos foi realizado conforme procedimento descrito a seguir: os pools de mosquitos foram descongelados e macerados em temperatura ambiente. Durante a maceração foi adicionado em cada pool, 300 µL de Reagente TRIzol® (*Thermo Fisher Scientific*), que isola o RNA total a partir de tecidos e

células e mantém a integridade do mesmo, utilizando o *Pellet Pestle Motor* (Sigma-Aldrich) com pistilos cônicos autoclavados acoplados ao mesmo.

Retirou-se 350 µL do pool macerado e em seguida adicionou-se 750 µL de Trizol, agitou-se em vórtex por 15 segundos e deixou 5 minutos em temperatura ambiente (TA), em seguida adicionou-se 200 µL de clorofórmio, homogeneizou vigorosamente no vórtex por 15 segundos e incubado por 10 minutos a TA, centrifugou-se a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.

Transferiu-se apenas o sobrenadante (RNA) para um novo tubo de 1,5 mL e foi adicionado 500 µL de isopropanol 100% e incubado por 10 min a temperatura ambiente, posteriormente o tubo foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 min a 4°C. Cuidadosamente desprezou-se o sobrenadante para não perder o precipitado (pellet). Lavou-se o pellet de RNA com 1 mL de álcool 75% (gelado) e centrifugou-se a 7.500 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente para evitar perda do precipitado, e o tubo ficou aberto para secar o álcool por 5-10 min em TA, em seguida foi realizada a etapa de eluição com 30 µL de H₂O pura livre de RNase e armazenado a -80°C até o momento do uso.

4.6.4. Reação de Transcrição Reversa

Para síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA extraído, utilizou-se a enzima Transcriptase Reversa a SuperScript III (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O protocolo foi adaptado utilizando 30µL (2 – 200 ng/ µL) do RNA extraído, 1 µL de random hexamers (50 ng/µL), 1 µL de dNTP (Mix de 10 mM), 10 µL de tampão 5X contendo 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375m MKCl, 15 Mm MgCl₂, 1 µL de DTT- *Dithiothreitol* (0,1 M) , 40 U de inibidor de RNA, 100 U da enzima *SuperScript®* III na reação, e água pura para completar volume de 50µL. A reação foi incubada em termociclador Applied Biosystems, sob a ciclagem de 5 min a 65°C, 5 min a 25°C, 50 min a 50°C e 15 min a 70°C.

4.6.5. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR Convencional

4.6.5.1. Análise *in silico*

Realizou-se um levantamento bibliográfico para a escolha parcial dos iniciadores utilizados na reação em cadeia da polimerase PCR. Também foram desenhados iniciadores para o presente estudo. A especificidade dos iniciadores foram analisados *in silico*, utilizando o programa Mega 6 e a ferramenta “*Basic Local Alignment Search Tool*” (Blast) onde realizou-se

um alinhamento dos iniciadores com as sequências cadastradas no *GenBank*, disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

4.6.5.2. Análise *in vitro*

4.6.5.2.1. PCR do gene NS5 de *Flavivirus*

Realizou-se PCR convencional nos pools de mosquitos utilizando iniciadores específicos para o gene NS5 dos *Flavivirus*, amplificando um fragmento de 958 pb (BRONZONI *et al.*, 2005). A sequência dos iniciadores utilizados pode ser observada na tabela 01. A identificação do tipo de *Flavivirus* foi realizada através do sequenciamento dos pools positivos.

A reação de amplificação foi realizada a partir de 5 μ L (0.1ng/ μ L – 200 ng/ μ L) de cDNA, 5 U de HotMaster™ Polimerase, tampão 10x contendo 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 35 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1Mm DTT, 50% Glicerol, 0,5 % Tween® 20, 0,05% Igepal ® CA-630, Mix de dNTP a 10 mM, 10 pMol de cada iniciador e água pura para completar o volume de 50 μ L. Cada reação de PCR foi realizada utilizando controle positivo e negativo. A reação foi incubada no termociclador Applied Biosystems, sob a ciclagem de 5 min a 94°C, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 54°C por 1 min, 72°C por 2 min e 10 min a 72°C.

4.6.5.2.2. PCR do gene do envelope de *chikungunya*

Realizou-se PCR convencional nos pools de mosquitos utilizando iniciadores específicos para o gene do envelope de *chikungunya*, amplificando um fragmento de 205 pb. A sequência dos iniciadores utilizados pode ser observada na tabela 01.

A reação de amplificação foi realizada a partir de 5 μ L de cDNA (0.1ng/ μ L – 200 ng/ μ L), 5 U de HotMaster™ Polimerase, tampão 10x contendo 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 35 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1Mm DTT, 50% Glicerol, 0,5 % Tween® 20, 0,05% Igepal ® CA-630, Mix de dNTP a 10 mM, 10 pMol de cada iniciador e água pura para completar o volume de 25 μ L. Cada reação de PCR foi realizada utilizando controle positivo e negativo. A reação foi incubada no termociclador Applied Biosystems, sob a ciclagem de 2 min a 95°C, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 54°C por 30 seg, 68°C por 10 min.

4.6.5.2.3. PCR Duplex

Realizou-se PCR duplex convencional nos pools de mosquitos utilizando iniciadores específicos para o gene da poliproteína estrutural do vírus Mayaro e o gene da proteína L (polimerase) do vírus Oropouche. A sequência dos iniciadores utilizados pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2: Descrição dos pares de iniciadores utilizados na PCR

PCR	INICIADOR	SEQUÊNCIA	AMPLICON (pb)	REGIÃO	AUTOR
<i>Flavivirus</i>	FG1	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTAT	958 pb	NS5	(BRONZONI <i>et al.</i> , 2005)
	FG2	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA			
<i>Chikungunya</i>	CK1	ACGCAATTGAGCGAAGCAC	205 pb	Envelope	(DASH <i>et al.</i> , 2008)
	CK2	CTGAAGACATTGGCCCCAC			
<i>Mayaro</i>	MAY1F1	GGAGTGCCGTTGCCAGTGC	477 pb	Poliproteína	Desenhado
	MAY1R1	ATGGTCACCGTTCACATACGCC		Estrutural	
Duplex <i>Oropouche</i>	ORO1F1	GCAGAGCTGCAAAYCTYGAGTAYAG	425 pb	Proteína L	Desenhado
	ORO1R1	GGYAATGTCATTGTRAATTCTCCTTG		(Polimerase)	

A reação de amplificação foi realizada a partir de 5 µL de cDNA (0.1ng/ µL – 200 ng/ µL), 5 U de HotMaster™ Polimerase, tampão 10x contendo 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 35 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1Mm DTT, 50% Glicerol, 0,5 % Tween® 20, 0,5% Igepal ® CA-630, Mix de dNTP a 10 mM, 10 pMol de cada iniciador e água pura para completar o volume de 50 µL. Cada reação de PCR foi realizada utilizando controle positivo e negativo. A reação foi incubada no termociclador Applied Biosystems, sob a ciclagem de 3 min a 95°C, 30 ciclos de 95°C por 30 seg, 60°C por 30 seg, 68°C por 1 min.

4.6.5.2.4. Análise do Produto Amplificado

Para a detecção do produto amplificado na PCR, o mesmo foi aplicado em gel de agarose com percentual de 1,5% em tampão TAE 1X (Tampão Tris-Acetate - Tris 40mM, Ac. Acético 20mM, EDTA 1mM) na corrida. Para visualização do gel, o mesmo foi corado com GelRed 10X e submetido à luz ultravioleta.

5. RESULTADOS

5.1. MOSQUITOS

Dentre os mosquitos da subfamília Culicinae capturados durante os três eventos de amostragem (27.899 indivíduos), selecionou-se 95 espécimes da localidade da Flona do Jamari, 1.901 de Santo Antônio e 1.841 do Sítio São Vicente, totalizando 3.837 espécimes de mosquitos analisados para detecção de arbovírus nesse estudo. Destes, 3.704 espécimes pertencentes à mesma espécie ou morfotipo e as mesmas condições de captura (armadilha, estrato e local) foram agrupados em 302 pools (2-36 indivíduos). Algumas espécies possuíam um único indivíduo capturado por evento de captura, sendo assim, 133 espécimes foram analisados individualmente (Tabela 3). Em relação à classificação taxonômica dos mosquitos selecionados, os espécimes do gênero *Culex* (43,46%) e de *Coquillettidia* (20,85%) demonstraram ser os mais abundantes, conforme a Tabela 4. A descrição das espécies processadas no presente estudo foi demonstrada na Tabela 5, os exemplares que não possuíam características morfológicas suficientes para determinar sua espécie, foram classificados em grupos de morfotipos ou apenas determinou-se o gênero e quando possível o subgênero.

Tabela 3 – Número de pools e de espécimes processados individualmente para detecção de arbovírus conforme local de estudo durante as três amostragens.

Local	Nº de Pools (Espécimes)	Nº de Espécimes	Total de espécimes
Flona do Jamari	15 (76)	19	95
Santo Antônio	141 (1858)	43	1901
Sítio São Vicente	146 (1770)	71	1841
Total Geral	302 (3.704)	133	3.837

Tabela 4 – Distribuição de mosquitos processados para detecção de arbovírus conforme gênero, coletados durante as três amostragens.

Gênero	Mosquitos	
	(Nº)	(%)
<i>Culex</i>	1.668	43,5
<i>Coquillettidia</i>	800	20,8
<i>Aedeomyia</i>	761	19,8

<i>Mansonia</i>	361	9,4
<i>Aedes</i>	74	1,9
<i>Uranotaenia</i>	73	1,9
<i>Psorophora</i>	71	1,8
<i>Orthopodomyia</i>	16	0,4
<i>Chagasia</i>	4	0,1
<i>Wyeomyia</i>	4	0,1
<i>Limatus</i>	2	0,05
<i>Sabethes</i>	2	0,05
<i>Haemagogus</i>	1	0,03
Total Geral	3.837	100,00

Tabela 5 – Espécies de culicíneos coletados em áreas de florestas de Rondônia.

Espécies	Número de Espécimes			
	Flona do Jamari	Santo Antônio	Sítio São Vicente	Total Geral
<i>Aedeomyia squamipennis</i>	9	301	451	761
<i>Aedes fluviatilis</i>			2	2
<i>Aedes fulvithorax</i>		1	7	8
<i>Aedes fulvus</i>		3	7	10
<i>Aedes hortator</i>			1	1
<i>Aedes scapularis</i>		2	30	32
<i>Aedes serratus</i>		2	10	12
<i>Aedes spp.</i>			9	9
<i>Chagasia bonnae</i>			4	4
<i>Coquillettidia albicosta</i>		1		1
<i>Coquillettidia arribalzagae</i>		1		1
<i>Coquillettidia lynchi</i>	1	83	1	85
<i>Coquillettidia nigricans</i>		218		218
<i>Coquillettidia shannoni</i>		262		262
<i>Coquillettidia spp.</i>			3	3
<i>Coquillettidia venezuelensis</i>		214	16	230
<i>Culex (Culex) cf. aquarius</i>		1		1
<i>Culex (Culex) nigripalpus</i>		5		5
<i>Culex (Culex) quinquefasciatus</i>		108	178	286
<i>Culex (Culex) restuans/declarator</i>		3		3
<i>Culex (Culex) salinarius</i>	5			5
<i>Culex (Culex) scimitar</i>		1		1

Espécies	Número de Espécimes			
	Flona do Jamari	Santo Antônio	Sítio São Vicente	Total Geral
<i>Culex (Culex) sp.</i>	1			1
<i>Culex (Culex) sp.4</i>	49	343	260	652
<i>Culex (Melanoconion) sp.1</i>			185	185
<i>Culex (Melanoconion) sp.2</i>			51	51
<i>Culex (Melanoconion) sp.3</i>		30	351	381
<i>Culex (Melanoconion) sp.5</i>			56	56
<i>Culex (Melanoconion) sp.7</i>		8		8
<i>Culex (Melanoconion) spp.</i>	6			6
<i>Culex spp.</i>			27	27
<i>Haemagogus sp.</i>	1			1
<i>Limatus durhamii</i>	1	1		2
<i>Mansonia amazonensis</i>		38	15	53
<i>Mansonia indubitans</i>		3		3
<i>Mansonia flaveola</i>		3		3
<i>Mansonia fonsecai</i>		21		21
<i>Mansonia humeralis</i>			23	23
<i>Mansonia pseudotitillans</i>		7	4	11
<i>Mansonia sp.</i>			3	3
<i>Mansonia titillans</i>		221	11	232
<i>Mansonia wilsoni</i>			12	12
<i>Orthopodomyia fasciipes</i>	16			16
<i>Psorophora albipes</i>			15	15
<i>Psorophora cingulata</i>			21	21
<i>Psorophora ferox</i>	2		5	7
<i>Psorophora lutzii</i>		7	19	26
<i>Psorophora sp.</i>	1		1	2
<i>Sabethes cyaneus</i>			1	1
<i>Sabethes sp.</i>			1	1
<i>Uranotaenia calosomata</i>		1	9	10
<i>Uranotaenia geometrica</i>		7	47	54
<i>Uranotaenia sp. 2</i>	1			1
<i>Uranotaenia spp.</i>	1	5	2	8
<i>Wyeomyia sp.</i>	1		3	4
Total Geral	95	1.901	1.841	3.837

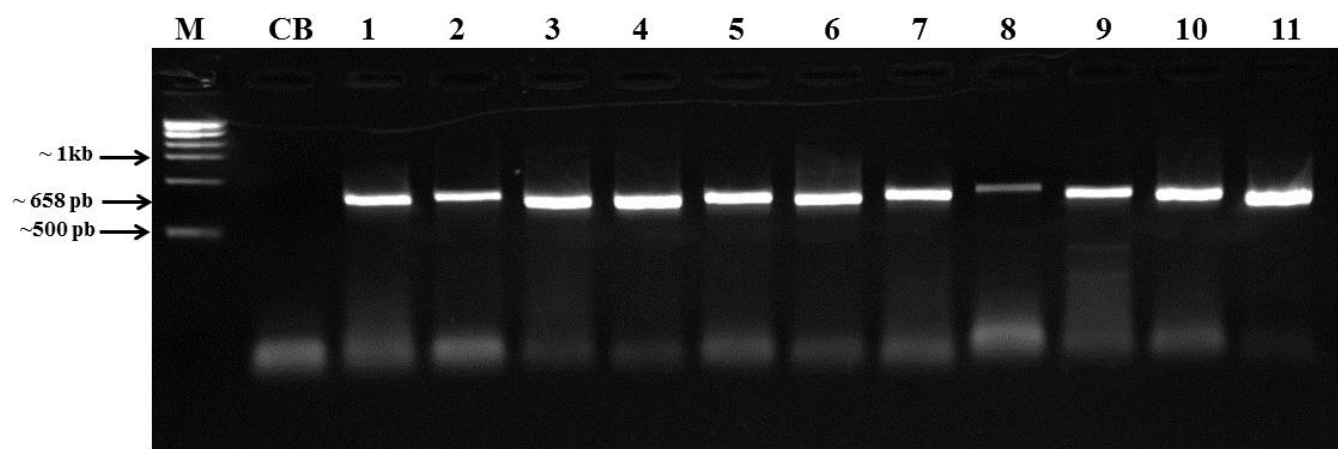
5.2. IDENTIFICAÇÃO POR DNA *BARCODE*

Foram escolhidos 40 indivíduos do gênero *Culex* agrupados em diferentes morfotipos (Tabela 6). Porém, houve amplificação do gene COI por PCR em apenas 37 amostras. A Figura 12 ilustra produtos da PCR analisados por eletroforese em gel de agarose.

Tabela 6 – Descrição dos espécimes submetidos à identificação por DNA *BARCODE*.

Código	Gênero (subgênero) espécie	Localidade	Resultado da PCR
SA155A1	<i>Culex (Culex) quinquefasciatus</i>	Santo Antônio	(+)
SA155A2	<i>Culex (Culex) quinquefasciatus</i>	Santo Antônio	(+)
SA155A3	<i>Culex (Culex) quinquefasciatus</i>	Santo Antônio	(+)
SA155A4	<i>Culex (Culex) quinquefasciatus</i>	Santo Antônio	(+)
ST82	<i>Culex (Culex) sp.</i>	Santo Antônio	(+)
ST01	<i>Culex (Culex) sp.</i>	Santo Antônio	(+)
ST134	<i>Culex (Culex) sp.</i>	Santo Antônio	(+)
ST145	<i>Culex (Culex) sp.</i>	Santo Antônio	(+)
ST155	<i>Culex (Culex) sp.</i>	Santo Antônio	(+)
SV104A1	<i>Culex (Culex) sp.4</i>	São Vicente	(+)
SV104A2	<i>Culex (Culex) sp.4</i>	São Vicente	(+)
SV104A3	<i>Culex (Culex) sp.4</i>	São Vicente	(+)
SV104A4	<i>Culex (Culex) sp.4</i>	São Vicente	(+)
S20	<i>Culex (Melanoconion) sp.</i>	Santo Antônio	(+)
S24	<i>Culex (Melanoconion) sp.</i>	Santo Antônio	(+)
ST141A1	<i>Culex (Melanoconion) spp.</i>	Santo Antônio	(+)
ST141A2	<i>Culex (Melanoconion) spp.</i>	Santo Antônio	(+)
ST141A3	<i>Culex (Melanoconion) spp.</i>	Santo Antônio	(+)
ST141A4	<i>Culex (Melanoconion) spp.</i>	Santo Antônio	(+)
ST141A5	<i>Culex (Melanoconion) spp.</i>	Santo Antônio	(+)
SV153A1	<i>Culex (Melanoconion) sp.1</i>	Santo Antônio	(+)
SV153A2	<i>Culex (Melanoconion) sp.1</i>	Santo Antônio	(+)
SV153A3	<i>Culex (Melanoconion) sp.1</i>	Santo Antônio	(+)
SV153A4	<i>Culex (Melanoconion) sp.1</i>	Santo Antônio	(+)
SV153A5	<i>Culex (Melanoconion) sp.1</i>	Santo Antônio	(+)
SV268A1	<i>Culex (Melanoconion) sp.2</i>	São Vicente	(+)
SV268A2	<i>Culex (Melanoconion) sp.2</i>	São Vicente	(+)
SV268A3	<i>Culex (Melanoconion) sp.2</i>	São Vicente	(+)
SV268A4	<i>Culex (Melanoconion) sp.2</i>	São Vicente	(+)
SV268A5	<i>Culex (Melanoconion) sp.2</i>	São Vicente	(+)
J65A1	<i>Culex (Melanoconion) sp.3</i>	São Vicente	(+)
J65A2	<i>Culex (Melanoconion) sp.3</i>	São Vicente	(-)
J65A3	<i>Culex (Melanoconion) sp.3</i>	São Vicente	(+)
F5A1	<i>Culex (Melanoconion) sp.5</i>	Flona do Jamari	(-)
F5A2	<i>Culex (Melanoconion) sp.5</i>	Flona do Jamari	(+)
F5A3	<i>Culex (Melanoconion) sp.5</i>	Flona do Jamari	(-)
F5A4	<i>Culex (Melanoconion) sp.5</i>	Flona do Jamari	(+)
F5A5	<i>Culex (Melanoconion) sp.5</i>	Flona do Jamari	(+)
SV219A1	<i>Culex (Melanoconion) sp.7</i>	Santo Antônio	(+)
SV219A2	<i>Culex (Melanoconion) sp.7</i>	Santo Antônio	(+)

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose da PCR do gene COI.



Legenda: Foto da eletroforese em gel de agarose corado com GelRed (1,5%) do produto da PCR convencional que amplifica um fragmento de 658 pb. M: Marcador de peso molecular 1Kb (DNA Ladder – Invitrogen); CB: Controle Branco; 1 – 11: Espécimes de *Culex* spp.

A análise filogenética incluiu além das sequências obtidas nesse estudo, 1.000 sequências de espécies depositadas no banco de dados do GenBank similares as 10 sequências consenso, a fim de aumentar o número de espécies para que a metodologia pudesse ser testada com maior robustez. Após remoção das sequências repetidas, foi construída uma árvore filogenética pelo método Neighbour com bootstrap de 1.000 repetições, modelo de substituição Kimura 2-parâmetros, onde foram observados os clados formados, mantendo apenas sequências do gênero *Culex* e uma sequência de cada clado da árvore. Nos clados que continha os exemplares desse estudo nenhuma sequência foi removida. Ao final, foram incluídas na análise final 127 sequências (Tabela 7) depositadas no GenBank do gene COI de espécies do gênero *Culex*.

Para realizar a delimitação inicial das espécies pelo ABGD, acrescentou-se ao conjunto de dados das 10 sequências desse estudo as 127 sequências depositadas no GenBank, com o objetivo de garantir um resultado mais consistente dos grupos de espécies presentes nesse conjunto. A partição do conjunto de dados das 137 sequências, foi realizada pelo método ABGD, usando um intervalo de divergência intraespecífica prévia (P) de 0,001 – 0,1, o qual mostrou cinco partições iniciais que suportaram 80 - 88 grupos (isto é, espécies) definidos em nossos dados. O banco de

dados continha 75 espécies do gênero *Culex*, 9 espécies near, cinco sequências de *Culex* spp. que não foram identificadas em espécie e as 10 sequências de *Culex* spp; obtidas nesse estudo.

Desses grupos, oito continham os exemplares do presente estudo (Tabela 8). As sequências depositadas no GenBank são espécies do gênero *Culex* previamente definidas, sendo assim, o agrupamento pelo ABGD das sequências obtidas com as sequências depositadas, supõe que seja a espécie dos exemplares deste trabalho. Porém, a confirmação dessas espécies foi realizada através da análise filogenética do conjunto de dados pelo método de Neighbour joining (Figura 15) e pela distância média entre os espécimes.

Tabela 8 – Delimitação inicial das espécies pelo ABGD do conjunto de dados das sequências desse estudo (em negrito) e sequências depositadas no GenBank (código de acesso).

Grupos	Sequências
01	ST141A1 , HE600697 (<i>Culex (Culex) brethesi</i>) HE605120 (<i>Culex (Culex) eduardoi</i>), KF919200 (<i>Culex (Culex) camposi</i>), KF919226 (<i>Culex maxi</i>), KF919232 (<i>Culex (Culex) saltanensis</i>), KF919233 (<i>Culex (Culex) surinamensis</i>), KM592996 (<i>Culex sp</i>), KX671403 (<i>Culex (Culex) coronator</i>), KX671406 (<i>Culex (Culex) usquatus</i>)
02	J65A1
03	J65A3
04	S20 , KX7798889 (<i>Culex (Melanoconion) nr. portesi</i>)
05	SA219A1, SA219A2
06	SV104A3 , KX779788 (<i>Culex bastagarius</i>), KX779789 (<i>Culex bastagarius</i>)
07	SV104A4
08	SV268A1, SV268A2 , KX779819 (<i>Culex idottus</i>)

Tabela 7 – Lista de sequências do gene COI de espécies do gênero *Culex* depositadas no GenBank

AB690849.1_Culex_tritaeniorhynchus	KF919200.1_Culex_camposi_voucher_MS4_38
AB690850.1_Culex_tritaeniorhynchus	KF919207.1_Culex_brethesi_voucher_M111
AB690855.1_Culex_tritaeniorhynchus	KF919226.1_Culex_maxi_voucher_M048
AB738093.1_Culex_pseudovishnui	KF919232.1_Culex_saltanensis_voucher_F010
AB738104.1_Culex_fuscocephala	KF919233.1_Culex_surinamensis_voucher_CDC3_1
AB738189.1_Culex_hayashii	KF919234.1_Culex_tatoi_voucher_M091
AB738191.1_Culex_cinctellus	KF919248.1_Culex_acharistus_voucher_SP56_R
AB738201.1_Culex_sitiens	KJ012074.1_Culex_hortensis_voucher_MBIM1C3
AB738225.1_Culex_tuberis	KJ012078.1_Culex_hortensis_voucher_TURKEY12A02
AB738288.1_Culex_infantulus	KJ012087.1_Culex_laticinctus_voucher_MBIM1G3
HACO1001_Culex panocossa	KJ012207.1_Culex_theileri_voucher_MBIM10C11
HE600697.1_Culex_brethesi	KM258189.1_Culex_pipiens_voucher_RBINS:IG_32.776/216
HE605120.1_Culex_eduardoi	KM457618.1_Culex_sp.
HE997130.1_Culex_torrentium	KM592996.1_Culex_sp.
HF562548.1_Culex_torrentium_mitochondrial_voucher_SAW_32	KM593000.1_Culex_corniger_voucher_ZFMK:PR015
JX259908.1_Culex_inhibitor_voucher_NEONTculicid2213	KM593020.1_Culex_sp.
KF406797.1_Culex_fuscocephala_voucher_NIBGE_MOS	KM593023.1_Culex_erraticus_voucher_ZFMK:PR038
KF406798.1_Culex_fuscocephala_voucher_NIBGE_MOS00399	KM593025.1_Culex_lucifugus_voucher_ZFMK:PR040
KF407880.1_Culex_tritaeniorhynchus_voucher_NIBGE_MOS00373	KM593027.1_Culex_lucifugus_voucher_ZFMK:PR042
KF671015.1_Culex_bonnei_voucher_CCDB10764E01	KM593028.1_Culex_sp._ZFMK_PR043
KF671018.1_Culex_serratimarge_voucher_CCDB10764B06	KM593029.1_Culex_erraticus_voucher_ZFMK:PR044
KF919190.1_Culex_quinquefasciatus_voucher_F009	KM593030.1_Culex_sp._ZFMK_PR045
KF919193.1_Culex_declarator_voucher_SP74_41	KM593031.1_Culex_erraticus_voucher_ZFMK:PR046
KF919196.1_Culex_dolosus_voucher_SP54_104	KM593042.1_Culex_educator_voucher_ZFMK:PR057
KM593044.1_Culex_lucifugus_voucher_ZFMK:PR059	KX779786.1_Culex_aureonotatus_voucher_GO1_108
KM593047.1_Culex_lucifugus_voucher_ZFMK:PR062	KX779788.1_Culex_bastagarius_voucher_MS2_104

KM593048.1_Culex_conspirator_voucher_ZFMK:PR063
 KM593049.1_Culex_theobaldi_voucher_ZFMK:PR064
 KM593050.1_Culex_conspirator_voucher_ZFMK:PR065
 KR680263.1_Culex_tarsalis_voucher_BIOUG12710B01
 KR680622.1_Culex_tarsalis_voucher_BIOUG07041D11
 KT608616.1_Culex_restuans_voucher_BIOUG22837G10
 KU187037.1_Culex_antennatus
 KU187050.1_Culex_antennatus
 KU187054.1_Culex_tenagius
 KU187064.1_Culex_watti
 KU187069.1_Culex_thalassius
 KU187075.1_Culex_duttoni
 KX379617.1_Culex_ribeirensis
 KX379623.1_Culex_pedroi
 KX379626.1_Culex_pedroi
 KX671403.1_Culex_coronator_voucher_SP81_36
 KX671406.1_Culex_usquatus_voucher_SP145_37
 KX779776.1_Culex_akritos_voucher_akri1
 KX779779.1_Culex_(Melanoconion)_nr._aliciae
 KX779781.1_Culex_aliciae_voucher_MG31_1
 KX779783.1_Culex_aliciae_voucher_MG57_13
 KX779784.1_Culex_aliciae_voucher_RJ19_46
 KX779840.1_Culex_(Melanoconion)_nr._rabelloi
 KX779841.1_Culex_(Melanoconion)_nr._rabelloi
 KX779843.1_Culex_vaxus_voucher_TO1_9
 KX779845.1_Culex_oedipus_voucher_IG1_1
 KX779846.1_Culex_(Melanoconion)_nr._pedroi_ped1
 KX779848.1_Culex_pereyrai_voucher_IG1_2
 KX779789.1_Culex_bastagarius_voucher_SP70_106
 KX779791.1_Culex_clarki_voucher_SP68_133
 KX779792.1_Culex_clarki_voucher_SP67_1
 KX779795.1_Culex_corentynensis_voucher_PA1_1
 KX779796.1_Culex_dunni_voucher_MG08_102
 KX779797.1_Culex_dunni_voucher_SP68_35
 KX779798.1_Culex_dyius_voucher_RJ19_104
 KX779802.1_Culex_eastor_voucher_east_4
 KX779807.1_Culex_eknomios_voucher_SE_8
 KX779809.1_Culex_ensiformis_voucher_ES18_109
 KX779810.1_Culex_ensiformis_voucher_ens_3c
 KX779811.1_Culex_ensiformis_voucher_MG54_16
 KX779815.1_Culex_evansae_voucher_ES25_6_
 KX779818.1_Culex_gnomatos_voucher_PNJ
 KX779819.1_Culex_idottus_voucher_SP71_117
 KX779824.1_Culex_intrincatus_voucher_PA2_3
 KX779826.1_Culex_intrincatus_voucher_PM1_1x
 KX779830.1_Culex_intrincatus_voucher_PM1_3
 KX779832.1_Culex_lacertosus_voucher_SO2_103
 KX779833.1_Culex_misionensis_voucher_2A_
 KX779836.1_Culex_(Melanoconion)_nr._aureonotatus
 KX779839.1_Culex_(Melanoconion)_nr._rabelloi
 KX779874.1_Culex_vaxus_voucher_IG20_2
 KX779878.1_Culex_zeteki_voucher_zet_5
 KX779881.1_Culex_crybda_voucher_AC307_12
 KX779883.1_Culex_crybda_voucher_AC316_8
 KX779886.1_Culex_(Melanoconion)_nr._gnomatos
 KX779887.1_Culex_(Melanoconion)_nr._pedroi

KX779849.1_Culex_pereyrai_voucher_IG1_3	KX779888.1_Culex_(Melanoconion)_nr._vomerifer
KX779852.1_Culex_portesi_voucher_VA_3	KX779889.1_Culex_(Melanoconion)_nr._portesi
KX779856.1_Culex_(Melanoconion)_nr._inhibitor	KX779891.1_Culex_(Melanoconion)_nr._theobaldi
KX779857.1_Culex_putumayensis_voucher_2b	KX779894.1_Culex_vomerifer_voucher_AC339_5
KX779858.1_Culex_putumayensis_voucher_3b	KY581235.1_Culex_bidens
KX779860.1_Culex_ribeirensis_voucher_rib_1	KY581255.1_Culex_interfor
KX779864.1_Culex_sacchettae_voucher_sach1	LC054501.1_Culex_tritaeniorhynchus
KX779867.1_Culex_serratimarge_voucher_PM1_2x	LC054502.1_Culex_vagans
KX779872.1_Culex_theobaldi_voucher_MS7	LC104322.1_Culex_hayashii
KX779873.1_Culex_trigeminatus_voucher_PA1_4	

Os exemplares SV268A1 e SV268A2 capturados na localidade de São Vicente, foram identificados a partir de suas características morfológicas como *Culex (Melanoconion)* sp. 2. Foram classificados pelo ABGD como da mesma espécie e agrupados com a espécie depositada no GenBank denominada de *Culex (Melanoconion) idottus* (KX779819) (Tabela 8). Os resultados das análises de agrupamento de sequências COI pelo método Neighbour Joining demonstraram a persistência consistentemente deste agrupamento na árvore (Figura 15) com alto bootstrap de 100% e distância média intraespecífica de 0,000. Sendo essa a provável espécie desses exemplares.

O exemplar SV104A3 coletado na localidade de São Vicente foi identificado a partir de suas características morfológicas em *Culex (Culex)* sp.4. Foi classificado como uma única espécie entre os exemplares desse estudo pelo ABGD (Tabela 8), e assim como no ABGD agrupou-se na árvore filogenética com a espécime do GenBank identificada como *Culex (Melanoconion) bastagarius* (KX779788), com alto bootstrap de 92% (Figura 15) e distância média intraespecífica de 0,000. Sendo essa a provável espécie desse exemplar.

O espécime SV104A4 coletado na localidade de Santo Antônio foi identificado a partir de suas características morfológicas em *Culex (Culex)* sp. 4. SV104A4 foi inicialmente classificado como uma espécie entre os exemplares desse estudo pelo ABGD (Tabela 8). Na árvore filogenética (Figura 15), apesar do baixo bootstrap de 20%, agrupou-se com espécimes do GenBank identificada como *Culex (Melanoconion) ensiformis* (KX779809, KX779810 e KX779811) com distância média intraespecífica de 0,031.

Os espécimes SA219A1 e SA219A2 coletados na localidade de Santo Antônio e foram identificados a partir de suas características morfológicas em *Culex (Melanoconion)* sp. 7. Os mosquito foram inicialmente classificados pelo ABGD como uma única espécie (Tabela 8). Na árvore filogenética (Figura 15) esses exemplares não se agruparam com nenhuma sequência de espécie depositada no GenBank, porém, permaneceram juntos no mesmo clado, com alto bootstrap de 100% e distância média intraespecífica de 0,008.

O exemplar ST141A1 foi coletado na localidade de Santo Antônio e identificado a partir de suas características morfológicas em *Culex (Melanoconion)* spp. Foi inicialmente classificado como uma espécie entre os exemplares desse estudo e agrupados com espécies do complexo coronator (*Culex (Culex) coronator*, *Culex (Culex) surinamensis*, *Culex (Culex) camposi*, *Culex (Culex) usquatus*), *Culex (Culex) saltanensis*, *Culex brethesi* *Culex (Culex) maxi*, *Culex (Culex)*

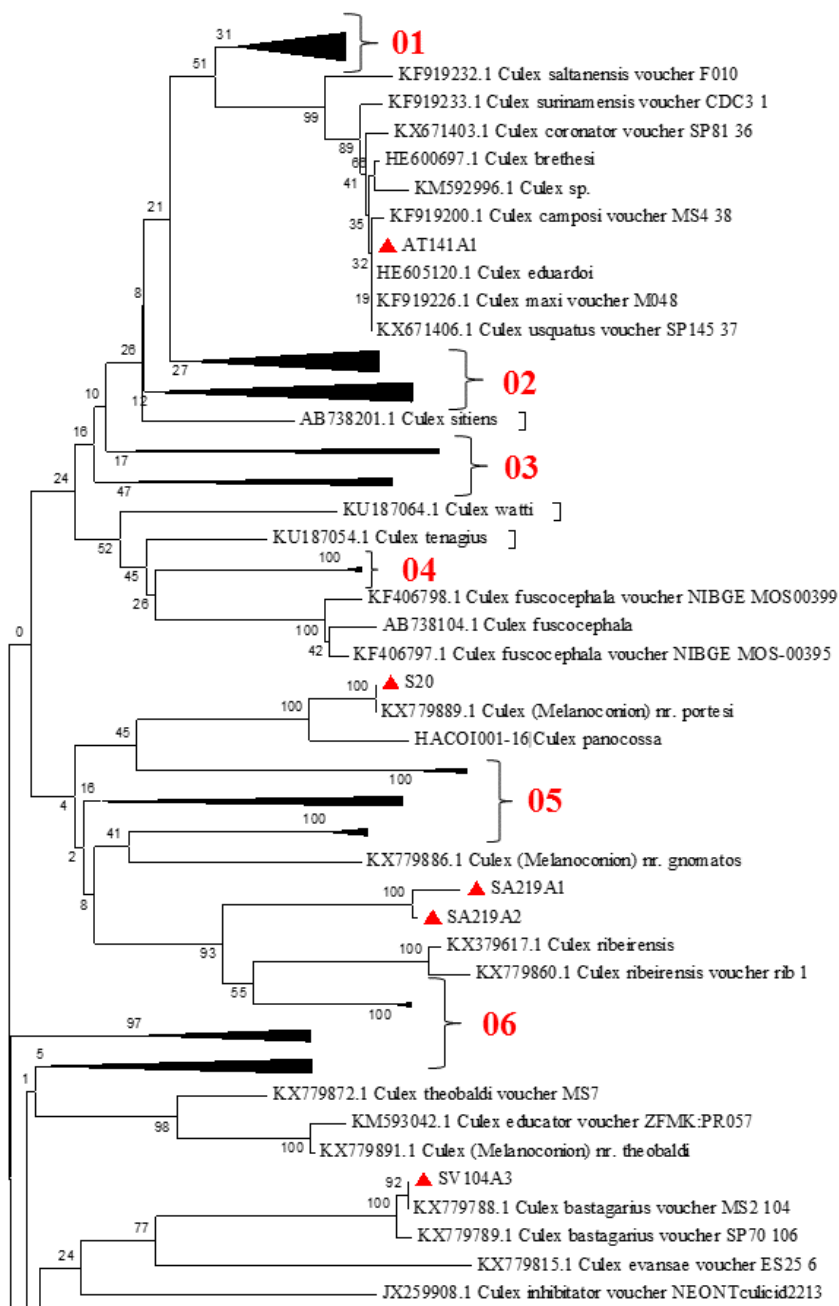
eduardoi pelo ABGD (Tabela 8). Esse agrupamento permaneceu na árvore filogenética (Figura 15) com bootstrap de 19 – 99% e distância média intraespecífica de 0,008.

O espécime S20 coletado na localidade de Santo Antônio identificado a partir de suas características morfológicas em *Culex (Melanoconion)* sp. Assim como no agrupamento realizado pelo ABGD, esse exemplar permaneceu no mesmo clado na árvore filogenética (Figura 15) com um espécime do GenBank identificado como *Culex (Melanoconion) nr. portesi* (KX779889), possuindo alto bootstrap de 100% e distância média intraespecífica de 0,000.

Quanto ao exemplar J65A3 coletado na localidade de São Vicente identificado a partir de suas características morfológicas em *Culex (Melanoconion)* sp.3. Inicialmente foi classificado com uma espécie entre os exemplares desse estudo e não foi agrupado com nenhuma espécie pelo ABGD (Tabela 8). Porém, na árvore filogenética (Figura 15) agrupou com os espécimes do GenBank identificada como *Culex (Melanoconion) lucifugus* (KM593025, KM593044, KM593027, KM593046) e um espécime do GenBank identificada como *Culex (Melanoconion) nr. aliciae* (KX779779), com alto bootstrap de 80% e distância média intraespecífica de 0,018.

O exemplar J65A1 coletado na localidade de São Vicente identificado a partir de suas características morfológicas em *Culex (Melanoconion)* sp.3. Também foi inicialmente classificado como uma espécie entre os exemplares desse estudo pelo ABGD. Observou na árvore filogenética (Figura 15) um agrupamento com um espécime do GenBank identificado como *Culex (Melanoconion) zeteki* (KX779878) e um espécime de *Culex* sp. (KM593028) com bootstrap de 76% e distância média intraespecífica de 0,034.

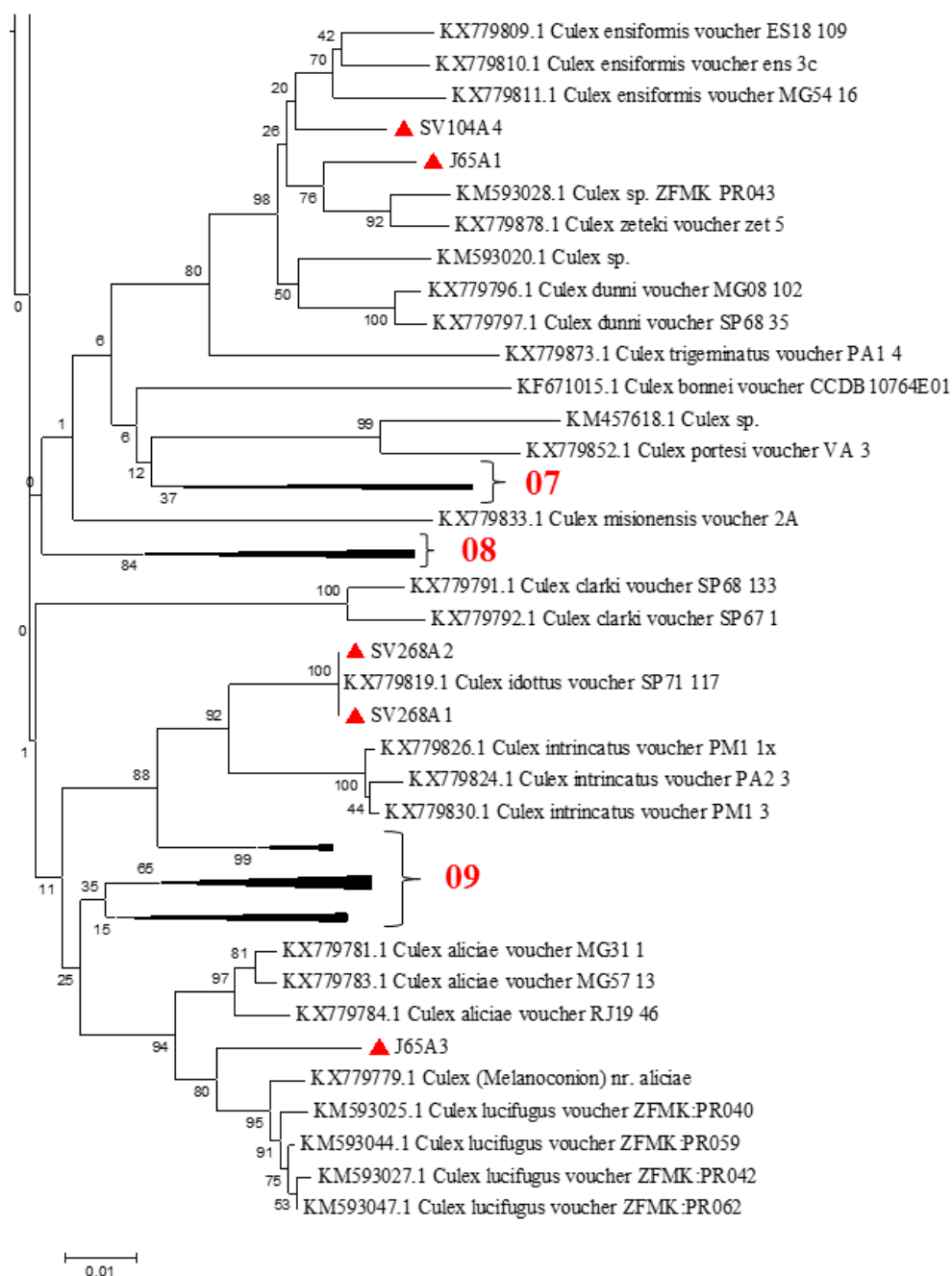
Figura 13 – Árvore filogenética do conjunto de dados das sequências do gene COI de morfotipos do gênero *Culex* desse estudo e sequências do gene COI de espécies de *Culex* depositadas no GenBank.



01	KF919193; KM593048; KY581255; KF919234; KY581235; KF919207; KF919196; KM593000; KF919248; KT608616; KR680263; KR680622.
02	KJ012087; KJ012207; KU187069; KU187075; LC054502; KM258189; KF919190; HE997130; HF562548; AB738189; LC104322; AB738093; KF407880; LC054501; AB690855; AB690849; AB690850.
03	AB738225; AB738288; AB738191; KJ012074; KJ012078.
04	KU187037; KU187050.
05	KX779848; KX779849; KX779818; KX779894; KX779888; KX779887; KX379623; KX379626; KX779846;
06	KX779881; KX779883; KX779843; KX779874; KX779836; KM593049; KX779807; KM593023; KX779786; KM593029; KM593031; KX779832; KM593030.

Legenda: Árvore filogenética do conjunto de dados das sequências do gene COI de morfotipos do gênero *Culex* desse estudo (▲ - vermelho) e sequências do gene COI de espécies de *Culex* depositadas no GenBank. A árvore foi obtida pelo método de Neighbour-joining com bootstrap de 1000 repetições. A distância foi calculada utilizando a fórmula de Kimura 2-parâmetros. Sequências 01 – 09 (Tabela 7).

Figura 13 – Árvore filogenética do conjunto de dados das sequências do gene COI de morfotipos do gênero *Culex* desse estudo e sequências do gene COI de espécies de *Culex* depositadas no GenBank (continuação).



07	KX779776; KX779864.
08	KX779798; KX779857; KX779858.
09	KM593050; KX779802; KX779839; KX779841; KX779840; KX779856; KX779845; KF671018; KX779795; KX779867.

Legenda: Árvore filogenética do conjunto de dados das sequências do gene COI de morfotipos do gênero *Culex* desse estudo (▲ - vermelho) e sequências do gene COI de espécies de *Culex* depositadas no GenBank. A árvore foi obtida pelo método de Neighbour-joining com bootstrap de 1000 repetições. A distância foi calculada utilizando a fórmula de Kimura 2-parâmetros. Sequências 01 – 09 (Tabela 7).

5.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ARBOVÍRUS EM MOSQUITOS

5.3.1. *Análise in silico*

Os iniciadores escolhidos e desenhados para reação de PCR em mosquitos mostraram ser específicos para os respectivos vírus quando submetidos à análise *in silico* utilizando a ferramenta BLAST e o programa MEGA7.

5.3.2. *Análise in vitro*

Após a extração do RNA os pools foram previamente quantificados utilizando o método de espectrofotometria, *NanoDrop*[™]- *Spectrophotometers* e se obteve uma variação de quantificação entre os mesmos de 20 ng/μL – 300 ng/μL de RNA. Do total de 3.837 espécimes de mosquitos analisados nenhum foi positivo para os vírus de importância médica do gênero *flavivirus*, vírus chikungunya, Mayaro e Oropouche.

6. DISCUSSÃO

Dos mosquitos selecionados, identificou-se a presença de 13 gêneros. *Culex*, *Coquilettidia*, *Aedeomya*, *Mansonia* e *Aedes* foram os gêneros prevalentes representando 43,5%, 20,8%, 19,8%, 9,4% e 1,9% respectivamente, do número total de exemplares analisados.

Os *Culex* spp. são mosquitos noturnos e crepusculares, período no qual se realizou as coletas. Além disso, a armadilha CDC utilizada neste estudo facilitou a captura destes, pois são muito atraídos pela luz artificial (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Os *Culex* spp. possuem representantes reconhecidos como vetores de diferentes arbovírus, tais como: *Culex (Melanoconion) pedroi* (vírus Ananindeua, vírus Capi, vírus Itaqui, vírus Encefalite Equina Oriental, vírus Encefalite Equina Ocidental, vírus Guama), *Culex (Culex) coronator* (vírus Caraparu, vírus Tucuruí) e *Culex (Culex) declarator* (vírus Moju, vírus Turlock e vírus Catu) (NUNES *et al.*, 2009).

Além dos arbovírus citados acima, mosquitos do gênero *Culex* têm sido relacionados a importantes arbovírus, como demonstrado em um recente estudo sobre a detecção de *Flavivirus* em pools de mosquitos de áreas verdes no estado de São Paulo – Brasil, aonde foi observado que dos pools positivos para *Flavivirus* 89,5% foram isolados em *Culex* spp. e 10,5% em *Aedes* spp. Entre os *Culex* spp., 58,8% eram *Culex quinquefasciatus* e 35,3% *Culex* spp. (FERNANDES *et al.*, 2016).

Entre as espécies de *Culex* analisadas no presente estudo merece destaque o *Cx. quinquefasciatus*, o qual é um vetor competente para o vírus do Nilo Ocidental, vírus da Encefalite Saint Louis, vírus Mayaro e vírus Oropouche (CARDOSO *et al.*, 2015; PEREIRA SERRA *et al.*, 2016). Além do que, em um estudo desenvolvido por Guedes e colaboradores (2016) foi demonstrado experimentalmente a capacidade vetorial de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* criados em laboratório para a infecção e disseminação do vírus Zika. As partículas virais foram encontradas no intestino, glândulas salivares e saliva desse mosquito alimentado artificialmente. Os autores também coletaram *C. quinquefasciatus* infectados pelo vírus Zika de áreas urbanas com alta incidência de microcefalia em Recife, Brasil.

Outro fato importante quanto ao gênero *Culex*, foi observado para a espécie *Cx. pipiens* capturados no sudoeste de Chicago, Estados Unidos. Estes foram encontrados infectados pelo vírus do Nilo Ocidental, sendo esta observação um critério para sugerir o *Culex pipiens* como um vetor enzoótico para esse vírus (HAMER *et al.*, 2008). Sendo assim, a variedade de arbovírus

isolados nos mosquitos do gênero *Culex*, demonstra a importância das investigações quanto a presença de arbovírus em *Culex* spp.

Os espécimes do gênero *Coquillettidia*, assim como os *Culex* possuem hábitos noturnos e crepusculares, são zoofílicos e exófilos, além de geralmente serem numerosos (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Esses mosquitos estão associados à transmissão de arbovírus, como a espécie *Cq. arribazagae* na qual o vírus Una e o vírus Oriboca foram isolados, a espécie *C. lynchi* foi encontrada infectada pelo vírus Wyeomyia. Arbovírus do gênero *Flavivirus*, *Orthobunyavirus* (vírus Guama, Catu, Oropouche), *Alphavirus* (vírus Mucambo) e o vírus Itaporanga pertencente ao gênero *Phlebovirus* tem sido isolados na espécie *Coquillettidia venezuelensis* (NUNES *et al.*, 2009). Apesar de diferentes arbovírus terem sido isolados em espécies do gênero *Coquillettidia*, as espécies analisadas no presente estudo *Cq. albicosta*, *Cq. arribazagae*, *Cq. lynchi*, *Cq. nigricans*, *Cq. shannoni*, *Cq. venezuelensis* não se mostraram infectadas por *flavivirus*, pelo vírus chikungunya, vírus Mayaro ou pelo vírus Oropouche.

Entre os mosquitos selecionados, o gênero *Mansonia* está entre os cinco gêneros mais abundantes no presente estudo, são extremamente incômodos, pois, possuem hematofagismo agressivo (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Gama e colaboradores (2012) investigaram a fauna de Culicidae em áreas rurais de Porto Velho, e observaram que os gêneros *Mansonia* e *Anopheles* são aqueles que apresentaram maior número de espécies. *Mansonia titillans* é considerada moderadamente suscetível ao vírus da encefalite equina Venezuelana (ASSUMPÇÃO, 2009). Webb e colaboradores (2008) investigaram a competência vetorial de *Mansonia septicornis* para o vírus de Ross River na Austrália e concluíram que o mesmo contribui para ciclos de transmissão local do vírus. A abundância de mosquitos *Mansonia*, além da variedade de hospedeiros deste gênero, faz com que esses mosquitos sejam sugeridos como potenciais vetores de arbovírus, entretanto, as espécies de *Mansonia* analisados nesse estudo, *Ma. amazonensis*, *Ma. fonsecai*, *Ma. humeralis*, *Ma. pseudotitillans*, *Ma. titillans* e *Ma. wilsoni*, não foram identificadas infectadas por arbovírus.

O gênero *Aedes* abrange duas espécies de grande importância médica, o *Aedes aegypti*, caracterizado por ser um mosquito tropical, mas, devido à globalização tornou-se endêmico em novas regiões, sendo vetor primário do vírus Dengue (DENV), vírus Chikungunya (CHIKV), vírus da Febre Amarela (YFV) e o vírus ZIKA (ZIKV). O *Aedes albopictus* é considerado um vetor competente para diversos arbovírus, incluindo DENV e CHIKV (CONWAY; COLPITTS;

FIKRIG, 2014). Nas grandes florestas tropicais da África Central e nas matas ciliares, os mosquitos *Aedes africanus* são os principais vetores do YFV silvestre (HANLEY; WEAVER, 2008). Apesar das espécies *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Ae. africanus*, não terem sido examinadas no presente estudo, a investigação de outras espécies do gênero *Aedes* capturados em áreas florestais infectados com arbovírus contribuiria para o conhecimento do possível papel deste gênero no ciclo silvestre de arbovírus em Rondônia.

Os culicídeos são dípteros da família Culicidae e representam um grupo diverso, com 3.555 espécies descritas atualmente. O gênero *Culex* pertence à subfamília Culicinae, tribo Culicini, com 769 espécies válidas, as quais estão incluídas em 26 subgêneros. Das espécies registradas, quase metade delas (~ 47%) pertencem aos subgêneros *Culex* (200 espécies) e *Melanoconion* (160 espécies). A sistemática e taxonomia desses grupos são complexas, e a identificação de espécies é realizada por meio de características de exemplares adultos, sendo a genitália masculina o principal caractere morfológico empregado. Os subgêneros especiosos ainda são informalmente organizados em Seção, Série, Grupo, Subgrupo e Complexos (HARBACH, 2013).

Apesar dos esforços em classificar as espécies de *Culex* (*Culex*), tanto Forattini (2002) quanto Harbach (2013) ressaltam que o cenário taxonômico atual é nebuloso. Existem algumas chaves dicotômicas, no entanto, a identificação de adultos é insatisfatória para várias espécies, mesmo com a complementação de estruturas de genitália masculinas e larvas. Tal fato resulta de agrupamentos nas chaves de identificação devido à existência de complexos ou da ausência de espécies nessas chaves (FORATTINI, 2002). Similarmente, o subgênero *Melanoconion* constitui um táxon de difícil identificação, já que sua separação de espécies se dá, muitas vezes, por meio da genitália masculina, com emprego auxiliar de exemplares em estágios pupal e larval (L4) Referência para esta sentença (REF).

Os estudos que envolvam inquéritos virológicos em mosquitos e levantamento de potenciais vetores silvestres de arbovirose, geralmente em localidades remotas, podem enfrentar desafios na determinação dessas espécies de mosquitos. No presente estudo algumas espécies dos referidos subgêneros foram agrupadas em morfoespécies, para as quais foram estabelecidas pranchas de identificação pictórica, com registro textual das principais características morfológicas de distinção [Anexo 02, exemplo da morfoespécie *Culex (Melanoconion)* sp. 2]. As equipes de campo eram orientadas a utilizar as pranchas na identificação de exemplares do

gênero *Culex*, juntamente às chaves dicotômicas propostas por Consoli; Lourenço-De-Oliveira (1994) e Forattini (2002). Dessa forma, o presente estudo tentou avaliar preliminarmente, o uso de pranchas pictóricas com algumas morfoespécies de *Culex* spp. de floresta visando à elaboração de um guia rápido de identificação em campo.

Hoyos-López e colaboradores (2016) realizaram investigação sobre a presença de arbovírus em mosquitos capturados na Colômbia caribenha e de modo similar, agruparam mosquitos em pools, baseando-se em similaridades nas características morfológicas, dada a dificuldade de diferenciação das espécies dos subgêneros *Culex* e *Melanoconion*.

Primeiramente é importante ressaltar que vários estudos conduzidos com a identificação molecular de insetos por meio da ferramenta de barcoding adotam limiares de valores para a distinção de espécies, considerando a variação intraespecífica e interespecífica. No estudo de Torres-Gutierrez e Sallum (2015) sobre o emprego de barcoding na identificação de mosquitos do subgênero *Melanoconion*, as autoras considerou as porcentagens de similaridade de sequências entre 98 e 100% como limiares aceitáveis de concordância para comparações par-a-par intraespecíficas.

Devido ao insucesso do sequenciamento de algumas poucas amostras, foram analisadas sequências de nucleotídeos correspondente a um fragmento de 630 pares de bases do gene COI de 10 exemplares do gênero *Culex*. A composição média de nucleotídeos foi 28,7% de A, 39,0% de T, 16,3% de C e 16,0% de G. Esses valores estão de acordo com outros dados de COI previamente descritos para outros grupos de insetos (TORRES-GUTIERREZ *et al.*, 2016). No conjunto de dados de 630pb havia 455 sítios conservados e 149 sítios variáveis.

Os resultados observados podem ser advento dos cenários propostos por Collins e Cruickshank (2014), nos quais a combinação pareada de informações taxonômicas morfológicas e moleculares podem auxiliar na resolução do status de uma espécie. O ABGD mostrou ser eficiente na delimitação inicial das espécies, porém, assim como descrito por Puillandre e colaboradores (2012) que a partição realizada pelo software não deve ser interpretada como uma delimitação final das espécies, mas como uma primeira hipótese de partição de espécies sobre a qual precisa se realizar análises posteriores.

Dois exemplares de *Cx. (Melanoconion)* morfoespécie sp. 2 (SV268A1/ SV268A2) formaram um agrupamento com a sequência já depositada de *Culex (Melanoconion) idottus*, com bootstrap de 100, permitindo a confirmação dessa morfoespécie como *Cx. idottus*. Da mesma

forma, duas fêmeas dessa espécie foram investigadas, e apresentaram 100% de identidade (par-a-par) por Torres-Gutierrez e colaboradores (2016). Quanto à biologia da espécie *Cx. idottus* foi capturado em vários estados brasileiros (DIBO *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2007; HUTCHINGS; SALLUM; HUTCHINGS, 2011) sendo observado que esta espécie realiza repasto em jacarés no Pantanal sul-mato-grossense, sendo encontrada naturalmente infectada com *Hepatozoon caimani*, um hemoparasita desses vertebrados (VIANA *et al.*, 2010).

Um exemplar do presente estudo (SV104A3), apresentou similaridade de 100% e bootstrap de 92 com duas sequências da espécie *Culex (Melanoconion) bastagarius* depositadas no GenBank. A referida espécie já possui registros de captura no estado de Rondônia, município de Ariquemes, aonde quatro exemplares foram coletados nos anos de 1987 e 1988. Estes se encontram depositados na Coleção de Culicidae (CCULI) da FIOCRUZ, e os registros estão disponíveis em várias bases de dados de biodiversidade. Essa espécie foi a mais abundante dentro do gênero *Culex*, em um estudo conduzido na Hidrelétrica de Samuel (Candeias do Jamari - RO), no qual foram obtidos 340 indivíduos por atração humana protegida ao longo de 12 meses (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; LUZ, 1996). O presente exemplar de *C. bastagarius* foi capturado no estrato florestal copa com armadilha luminosa CDC. No entanto, esta espécie foi predominantemente encontrada no sub-bosque de floresta da Floresta da UHE-Samuel, e a captura de exemplares em copas de árvores pode ser considerada como um evento de “transbordamento” – spillover passivo, e não é dependente da densidade de suas populações (JULIÃO *et al.*, 2010). Recentemente, Alencar e colaboradores (2016) analisaram a variabilidade fenotípica da espécie em função da sazonalidade, com base em morfometria geométrica das asas dos mosquitos. Os autores verificaram que o formato das asas não diferia entre estações, no entanto o tamanho das asas apresentou variações.

Vale ressaltar que inicialmente o exemplar SV104A3 havia sido categorizado como uma morfoespécie de *Culex (Culex)*. Dado que esses mosquitos foram capturados em armadilhas que possuem mecanismos de sucção de ar (CDC e BG-Sentinel), e que geralmente danificam os mosquitos, a ferramenta barcoding mostra-se de grande valia para corrigir eventuais erros de identificação e um bom suporte para orientar a elaboração de guias de identificação. Dessa forma, analisou-se outro indivíduo (SV104A4) que compunha o mesmo pool de mosquitos (SV104), agrupados em função de suas características morfológicas.

A caracterização molecular desse exemplar (SV104A4) em uma árvore filogenética com 137 sequências previamente selecionadas, agrupou com a espécie *Cx. (Mel.) ensiformis* como uma provável espécie com algum nível de similaridade genética ao exemplar, sendo que em 20 bootstraps esse agrupamento se manteve. No entanto, ao se analisar as sequências que formaram um maior agrupamento com SV104A4, e com maior bootstrap também (98), nota-se a inclusão de *Cx. (Mel.) zeteki*, *Cx. (Mel.) dunni*, e *Culex* sp., que juntamente a *Cx. (Mel.) ensiformis* compõe boa parte do Grupo Atratus. Esse resultado pode ser um indicativo de que o exemplar em questão pertence a uma espécie do Grupo Atratus que ainda não possui sequência depositada no GenBank. Além das espécies citadas, *Cx. atratus*, *Cx. caribeanus*, *Cx. commevynensis* e *Cx. trigeminatus* fazem parte desse grupo, sendo que encontradas sequências COI apenas para as duas últimas espécies. Sirivanakarn (1982) apresenta uma revisão do subgênero *Melanoconion*, na qual características morfológicas permitem distinguir o Grupo Bastagarius (SV104A3) do Grupo Atratus (SV104A4).

As sequências consenso de dois exemplares identificados no presente estudo como *Culex (Melanoconion)* morfoespécie 7 (Amostras SA219A1 e SA219A2) permaneceram juntas em 100% dos agrupamentos. Além disso, as sequências dessas amostras também se agruparam com sequências de *Cx. crybda* e *Cx. ribeirensis*, com bootstrap de 93. As duas espécies compartilham semelhanças morfológicas, e são igualmente agrupadas na Seção Spissipes, Grupo Crybda e Subgrupo Pedroi (SALLUM; FORATTINI, 1996), havendo indícios da morfoespécie do presente estudo consistir em uma espécie do mesmo grupo ou subgrupo que não tem a sequência subunidade I da citocromo oxidase (COI) conhecida ou divulgada. Além das citadas, *Cx. adamesi* e *Cx. pedroi* são as espécies que compõe o subgrupo, não havendo registros de COI para a primeira em questão.

Um exemplar erroneamente identificado em campo como pertencente ao subgênero *Melanoconion* (ST141A1), não se agrupou de forma consistente a nenhuma sequência específica. No entanto, houve um agrupamento suportado com valor de bootstrap de 99 com oito espécies de diferentes Grupos (Pipiens e Coronator) e Subgrupos do subgênero *Culex*. Resultado similar foi obtido por Laurito e colaboradores (2013), que concluíram que para mosquitos *Cx. (Culex)* spp. a metodologia de barcoding baseada na subunidade I da citocromo oxidase não contém informações suficientes para a distinção de espécies.

A sequência do indivíduo S20, identificado até o subgênero *Melanoconion* e não morfoespeciada, se agrupou fortemente (100 de bootstrap) com uma sequência de *Culex* (*Melanoconion*) nr. *portesi* e o agrupamento de ambos agrupou com uma terceira espécie com alto valor de bootstrap 100, *Cx. (Mel.) panocossa*. As duas espécies pertencem a grupos diferentes, Vomerifer e Ocossa, respectivamente, e podem ser distinguidas por caracteres morfológicos segundo Sallum (1994). Futuramente, será investigado o agrupamento associado à sequência depositada de *Cx. panocossa*.

A sequência de um exemplar (J65A3) da morfoespécie *Culex (Melanoconion)* sp. 3 não se agrupou de forma consistente a nenhuma sequência de espécie conhecida molecularmente. No entanto a sequência consenso se manteve agrupada em 93% das vezes a um grupo maior, composto por quatro sequências de *Cx. (Mel.) lucifugus*, três de *Cx. (Mel.) aliciae*, e uma de *Cx. (Mel.)* near *aliciae*, indicando a possibilidade de que o exemplar pertença a uma das duas espécies do Grupo Conspirator, ou espécie geneticamente similar, tanto já descrita morfológicamente mas sem sequências conhecidas, como uma espécie ainda não descrita. Num estudo recente, exemplares de *Cx. (Melanoconion) aliciae* próximo agruparam com as sequências do GenBank de *Cx. (Mel.) lucifugus*, sendo que os autores realçam a necessidade de revisão da espécie (TORRES-GUTIERREZ *et al.*, 2016). Outra amostra a J65A1, [morfoespécie *Culex (Melanoconion)* sp. 3] se manteve agrupada às espécies do Grupo Atratus, juntamente a amostra SV104A4, indicando outro equívoco durante a identificação por meio de guia rápido.

Quanto à divergência entre a identificação por morfoespécies e determinação de espécies por barcoding, verifica-se que a estratégia pode apresentar prós e contras. A vantagem de dispor de pranchas pictóricas na identificação de morfoespécies seria o auxílio que estas podem proporcionar às chaves dicotômicas. A desvantagem seria a possibilidade de sugestão ao observador, de forma que o mesmo restrinja a identificação apenas ao conteúdo do guia pictórico.

Além das informações quanto ao uso da região 5' do gene COI para identificação de morfotipos do gênero *Culex*, os dados apresentados neste trabalho são importantes para o fornecimento do histórico de infecção por arbovírus dos diferentes gêneros de mosquitos com ocorrência em fragmentos de floresta e reservas em Rondônia. Apesar do presente estudo não detectar *Flavivirus*, *CHIKV*, *MAYV* ou *OROV* nas amostras de mosquitos, diversos trabalhos encontraram exemplares ou pools infectados, no Brasil e Região Amazônica. O'Guinn e colaboradores (2004) capturaram na Bacia Amazônica, 3.227 espécimes de mosquitos *Culex*

(*Melanoconion*) *pedroi* distribuídos em 117 pools, sendo que destes cinco foram positivos para o vírus da encefalite equina Oriental (EEEV). Cardoso e colaboradores (2015) que investigaram a circulação de espécies *Orthobunyavirus* em áreas metropolitanas de Cuiabá, estado do Mato Grosso (MT) Brasil, obtiveram 8/387 pools de mosquitos de *Culex quinquefasciatus* positivos para o vírus Oropouche. A frequência de espécies de Culicidae infectado por *flavivirus* e *alphavirus* em Cuiabá foi verificada, sendo que dos 610 pools (11.090 espécimes) analisados 117 foram positivos para *flavivirus* e 16 para *alphavirus* (PEREIRA SERRA *et al.*, 2016).

Entretanto, segundo Gu e Novak, 2004, é comum em estudos com mosquitos, encontrar baixas taxas de infecção, assim como amostras sem nenhum exemplar infectado, demonstrando que para detectar baixos níveis de infecções em mosquito é necessário analisar um elevado número de amostras (superior a 1.600 indivíduos) para se ter uma probabilidade de detecção de 0,8. Além do que, os resultados obtidos nesse estudo corroboram com outros realizados, como de Pauvolid-Corrêa e colaboradores (2010) que visavam investigar a importância das espécies de Culicidae na transmissão de arbovírus no Pantanal brasileiro, e analisaram 1.689 espécimes agrupados em 78 pools e destes nenhum foi positivo para arbovírus.

O método para extração do RNA viral pode influenciar na detecção do vírus. Entretanto, O'Guinn e colaboradores (2004) observaram que foi possível detectar um mosquito infectado em um pool com até 49 mosquitos não infectados, portanto, a quantidade de mosquitos (2-37 espécimes) nos pools do presente estudo, provavelmente não constituiu fator limitante, na detecção viral.

A identificação de arbovírus em pools de mosquitos utilizada nesse estudo é uma alternativa econômica viável, tendo disponível diferentes ensaios que possibilitam tal identificação, como: culturas de células VERO, RT-PCR e imunoensaios, entre outros. Entretanto, esses ensaios possuem uma concentração limiar de detecção do vírus, sendo que quantidades de vírus abaixo desse limiar não podem ser identificadas (BUSTAMANTE; LORD, 2010; CHILES *et al.*, 2004). O método de PCR convencional desenvolvido no presente trabalho, é uma técnica sensível e específica (MORELI; COSTA, 2013) para detecção de arbovírus, porém, como qualquer outro método possui limitação, como o isolamento de vírus em amostras com baixa carga viral.

Além do que, experimentos desenvolvidos por Lanciotti e colaboradores (2000), demonstraram que a PCR Real Time – TaqMan é bem mais específica para detecção do vírus do

Nilo Ocidental (WNV) em pools de mosquitos comparado a PCR convencional, provavelmente, a redução da sensibilidade da PCR convencional se deve ao aumento da quantidade de proteínas e lipídeos nas extrações dos macerados de mosquitos, que podem inibir tanto a enzima de transcrição reversa quanto a enzima Taq polimerase, fato esse, que pode justificar a ausência de detecção de arbovírus em mosquitos por PCR convencional realizado nesse estudo.

A negatividade obtida no presente estudo também pode estar relacionada a fatores como o período de não epizootia durante a captura dos mosquitos e possível perda de infectividade do vírus devido às condições ambientais no campo, tais como os altos índices de temperatura e umidade na estação chuvosa, podem ter influenciado os resultados (PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2010).

Os mosquitos analisados neste estudo foram capturados no campo, local onde sofrem alterações diárias de temperatura e variação das condições microclimáticas dos seus locais de repouso, sendo que, uns dos fatores que influenciam a quantidade de vírus no mosquito, é a época do ano e a temperatura (BUSTAMANTE; LORD, 2010), pois, conforme estudo desenvolvido por Reisen e colaboradores (1993) que buscavam avaliar o efeito da temperatura na transmissão do vírus da encefalite equina (WEE) e do vírus da encefalite St. Louis (SLE) pelo *Culex tarsalis*, observaram que o mosquito permaneceu infectado pelo WEE e seu título viral não diminuiu significativamente ao longo do período de incubação em todas as temperaturas (10°C a 30°C). Entretanto, os autores observaram que a taxa de transmissão por fêmeas incubadas de 20°C a 30°C diminuíram acentuadamente em 7 a 10 dias posteriores à infecção. Em outro estudo, observou-se que *Culex tarsalis* infectados com vírus do Nilo Ocidental (WNV), mantidos em temperatura entre 22°C e 30° C, apresentaram título viral superior ao título das fêmeas mantidas a temperatura entre 14°C e 18°C (REISEN, WILLIAM K; FANG; MARTINEZ, 2006). Portanto, a falha da detecção de vírus no presente estudo, pode ter sido influenciada pela baixa quantidade de vírus nos mosquitos, devido o tempo entre o momento em que o mosquito se infectou e o momento de sua captura, ou devido às condições de temperatura no campo.

7. CONCLUSÃO

- Diferentes espécies de mosquitos Culicinae foram capturadas nas áreas de estudo.
- A região 5' do gene COI demonstrou ser um marcador eficaz na identificação de morfotipos do gênero *Culex*, que juntamente com as características morfológicas podem facilitar e aprimorar a identificação de espécies do gênero *Culex*. Entretanto, necessita-se de mais estudos que possibilitem o depósito nos bancos de dados de sequências da região COI das diferentes espécies do gênero *Culex*.
- Arbovírus de extrema importância médica foram pesquisados em mosquitos Culicinae, porém, alguns fatores como a baixa carga viral, o período de não epizootia durante a captura, assim como a quantidade de espécimes analisadas, podem ter influenciado na ausência de detecção de mosquitos infectados por arbovírus.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, J. *et al.* Phenotypic Plasticity In Response To Seasonal Variation In Populations of *Culex* (Melanoconion) *Bastagarius*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 32, n. 4, p. 333–336, dez. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28206857>>. Acesso em: 15 jun. 2017.
- ALMEIDA, P. G. Mosquitoes (Diptera, Culicidae) and their medical importance for Portugal: challenges for the 21st century. *Acta Médica Portuguesa*, v. 24, n. 6, p. 961–74, 2011. Disponível em: <<http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/viewFile/1419/1008>>. Acesso em: 4 mar. 2017.
- ANDERSON, C. R. *et al.* Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 6, n. 6, p. 1012–6, nov. 1957. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13487973>>. Acesso em: 26 jan. 2017.
- ANDERSON, C. R. *et al.* Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 10, p. 574–8, jul. 1961. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13683183>>. Acesso em: 26 jan. 2017.
- ASSUMPÇÃO, I. C. D. E. CHAVE DE IDENTIFICAÇÃO PICTÓRICA PARA O SUBGÊNERO *Mansonia* BLANCHARD, 1901 (DIPTERA, CULICIDAE) DA REGIÃO. v. 1901, 2009.
- AZEVEDO, R. S. S. *et al.* Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. *Emerging infectious diseases*, v. 15, n. 11, p. 1830–2, nov. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19891877>>. Acesso em: 26 jan. 2017.
- BALA MURUGAN, S.; SATHISHKUMAR, R. Chikungunya infection: A potential re-emerging global threat. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 9, n. 10, p. 933–937, 2016.
- BARZON, L. *et al.* Zika virus: from pathogenesis to disease control. *FEMS Microbiology Letters*, v. 363, n. 18, p. fnw202, set. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1093/femsle/fnw202>>. Acesso em: 19 maio 2017.

BEASLEY, D. W. C.; MCAULEY, A. J.; BENTE, D. A. Yellow fever virus: Genetic and phenotypic diversity and implications for detection, prevention and therapy. *Antiviral Research*, v. 115, p. 48–70, mar. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354214003611>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

BRASIL. *Floresta Nacional do Jamari (RO)*. Disponível em: <<http://www.florestal.gov.br/florestas-sob-concessao?id=101>>. Acesso em: 9 maio 2017.

BRIESE, T.; CALISHER, C. H.; HIGGS, S. Viruses of the family *Bunyaviridae*: Are all available isolates reassortants? *Virology*, v. 446, n. 1–2, p. 207–216, nov. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24074583>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

BRONZONI, R. V. D. M. *et al.* Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian *Alphaviruses* and *Flaviviruses* Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphavi. *J Clin Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 696–702, 2005.

BRYANT, J. E.; HOLMES, E. C.; BARRETT, A. D. T. Out of Africa: A Molecular Perspective on the Introduction of Yellow Fever Virus into the Americas. *PLoS Pathogens*, v. 3, n. 5, p. e75, 2007. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.0030075>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

BURT, F. J. *et al.* Chikungunya: a re-emerging virus. *The Lancet*, v. 379, n. 9816, p. 662–671, 18 fev. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22100854>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

BURT, F. J. *et al.* Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *The Lancet Infectious Diseases*, fev. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309916303851>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

BUSTAMANTE, D. M.; LORD, C. C. Sources of error in the estimation of mosquito infection rates used to assess risk of arbovirus transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, n. 6, p. 1172–1184, 2010.

CALVET, G. *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with

microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 6, p. 653–660, jun. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309916000955>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet (London, England)*, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 9 abr. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26948433>>. Acesso em: 6 ago. 2017.

CARDOSO, B. F. *et al.* Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 6, p. 745–754, set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26517653>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

CDC. *Arbovirus Catalog - CDC Division of Vector-Borne Diseases (DVBD)*. Disponível em: <<https://wwwn.cdc.gov/arbocat/VirusBrowser.aspx>>. Acesso em: 16 jun. 2017.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Symptoms / Zika virus / CDC*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/symptoms/symptoms.html>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Mosquito Life-Cycle / Dengue / CDC*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/m_lifecycle.html>. Acesso em: 12 fev. 2017.

CHAN, J. F. W. *et al.* Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *Journal of Infection*, v. 72, n. 5, p. 507–524, maio 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26940504>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

CHAN, M.; JOHANSSON, M. A. The Incubation Periods of Dengue Viruses. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, p. e50972, 30 nov. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0050972>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue--quo tu et quo vadis? *Viruses*, v. 3, n. 9, p. 1562–608, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21994796>>. Acesso em: 18 maio 2017.

CHENG, G. *et al.* Mosquito Defense Strategies against Viral Infection. *Trends in Parasitology*, v. 32, n. 3, p. 177–186, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2015.09.009>>.

CHILES, R. E. *et al.* Blinded laboratory comparison of the in situ enzyme immunoassay, the VecTest wicking assay, and a reverse transcription-polymerase chain reaction assay to detect mosquitoes infected with West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *Journal of medical entomology*, v. 41, n. 4, p. 539–44, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15311443>>.

COFFEY, L. L. *et al.* Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future Microbiology*, v. 8, n. 2, p. 155–176, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23374123>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

COFFEY, L. L.; FAILLOUX, A. B.; WEAVER, S. C. Chikungunya virus - vector interactions. *Viruses*, v. 6, n. 11, p. 4628–4663, 2014.

COLLINS, R. A.; CRUICKSHANK, R. H. Known Knowns, Known Unknowns, Unknown Unknowns and Unknown Knowns in DNA Barcoding: A Comment on Dowton et al. *Systematic Biology*, v. 63, n. 6, p. 1005–1009, 1 nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25116917>>. Acesso em: 15 jun. 2017.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. [S.l: s.n.], 1994. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/th>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

CONWAY, M. J.; COLPITTS, T. M.; FIKRIG, E. Role of the Vector in Arbovirus Transmission. *Annu. Rev. Virol*, v. 1, p. 71–88, 2014. Disponível em: <www.annualreviews.org>. Acesso em: 26 jan. 2017.

D GUEDES, D. R. *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. 2016.

DASH, P. K. *et al.* Development and evaluation of a 1-step duplex reverse transcription polymerase chain reaction for differential diagnosis of chikungunya and dengue infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 62, n. 1, p. 52–57, 2008.

DE SOUZA PINTO, I. *et al.* DNA barcoding of neotropical sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Species identification and discovery within Brazil. *PLoS ONE*, v. 10, n. 10, p. 1–18, 2015.

DE THOISY, B. *et al.* Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. *Emerging infectious diseases*, v. 9, n. 10, p. 1326–9, out. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14609474>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

DEJNIRATTISAI, W. *et al.* Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nature immunology*, v. 17, n. 9, p. 1102–8, set. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27339099>>. Acesso em: 20 maio 2017.

DEMARI-SILVA, B. *et al.* Taxonomic and phylogenetic relationships between species of the genus *Culex* (Diptera: culicidae) from Brazil inferred from the cytochrome c oxidase I mitochondrial gene. *J Med Entomol*, v. 48, n. 2, p. 272–279, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21485362>.

DIAMOND, M. S. *et al.* Innate and Adaptive Immune Responses Determine Protection against Disseminated Infection by West Nile Encephalitis Virus. *Viral Immunology*, v. 16, n. 3, p. 259–278, set. 2003. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/088282403322396082>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

DIAMOND, M. S.; PIERSON, T. C. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell*, v. 162, n. 3, p. 488–492, jul. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415008429>>. Acesso em: 19 maio 2017.

DIBO, M. R. *et al.* Presença de culicídeos em município de porte médio do Estado de São Paulo e risco de ocorrência de febre do Nilo Ocidental e outras arboviroses. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 4, p. 496–503, ago. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011000400019&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 15 jun. 2017.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological

specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 46, n. 5, p. 509–20, set. 1952. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12995440>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

DONALISIO, M. R. *et al.* Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. p. 10–15, 2017. Disponível em: <<http://www.rsp.fsp.usp.br/>>.

DUFFY, M. R. *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 11 jun. 2009. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0805715>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

DYER, O. Yellow fever stalks Brazil in Zika's wake. *BMJ*, v. 356, 2017.

ECDC. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. *Stockholm*, 2015.

ELLIOTT, R. M. *Orthobunyaviruses*: recent genetic and structural insights. *Nature Reviews Microbiology*, v. 12, n. 10, p. 673–685, 8 set. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25198140>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

FARAJOLLAHI, A. *et al.* Field efficacy of BG-Sentinel and industry-standard traps for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and West Nile virus surveillance. *Journal of medical entomology*, v. 46, n. 4, p. 919–25, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19645298>>.

FERNANDES, L. N. *et al.* Detection of *Culex flavivirus* and *Aedes flavivirus* nucleotide sequences in mosquitoes from parks in the city of São Paulo, Brazil. *Acta Tropica*, v. 157, p. 73–83, 2016.

FORATTINI, O. P. *Culicidologia médica*. [S.l.]: Edusp, 2002.

FRANZ, A. W. E. *et al.* Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*, v. 7, n. 7, p. 3741–67, 8 jul. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26184281>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

FROS, J. J.; PIJLMAN, G. P. *Alphavirus* Infection: Host Cell Shut-Off and Inhibition of

Antiviral Responses. *Viruses*, v. 8, n. 6, 11 jun. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27294951>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

GAMA, R. A. *et al.* Fauna of Culicidae in rural areas of Porto Velho and the first record of *Mansonia* (*Mansonia*) *flaveola* (Coquillett, 1906), for the state of Rondônia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 1, p. 125–127, 2012.

GAUCI, P. J. *et al.* Genomic Characterisation of Three Mapputta Group Viruses, a Serogroup of Australian and Papua New Guinean Bunyaviruses Associated with Human Disease. *PLOS ONE*, v. 10, n. 1, p. e0116561, 14 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25588016>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

GOMES, A. DE C. *et al.* Riqueza e abundância de Culicidae (Diptera) em área impactada, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 41, n. 4, p. 661–664, ago. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102007000400023&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 15 jun. 2017.

GU, W.; NOVAK, R. J. Short report: Detection probability of arbovirus infection in mosquito populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 71, n. 5, p. 636–638, 2004.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of medical research*, v. 33, n. 4, p. 330–42, [S.d.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12234522>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

HALL, T. *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>. , 1999

HALSEY, E. S. *et al.* Mayaro Virus Infection, Amazon Basin Region, Peru, 2010–2013. *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, n. 11, p. 1839–42, nov. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24210165>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

HAMER, G. L. *et al.* Rapid amplification of West Nile virus: the role of hatch-year birds. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, v. 8, n. 1, p. 57–67, 2008.

HANLEY, K. A.; WEAVER, S. C. Arbovirus Evolution. *Origin and Evolution of Viruses*. [S.l.]:

Elsevier, 2008. p. 351–391. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123741530000163>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

HARBACH, R. E. Classification within the cosmopolitan genus *Culex* (Diptera: Culicidae): The foundation for molecular systematics and phylogenetic research. *Acta Tropica*, v. 120, n. 1–2, p. 1–14, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.06.005>>.

HARBACH, R. E. *Mosquito Taxonomic Inventory*. Disponível em: <<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

HARBACH, R. E. Zootaxa, The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa*, v. 1668, p. 591–638, 2007. Disponível em: <www.mapress.com/zootaxa/>. Acesso em: 4 mar. 2017.

HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. *Emerging infectious diseases*, v. 15, n. 9, p. 1347–50, set. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19788800>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, v. 270, n. 1512, p. 313–21, 2003. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1691236&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HEBERT, P. D. N. *et al.* Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 41, p. 14812–14817, 2004.

HONÓRIO, N. A. *et al.* Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 31, n. 5, p. 906–908, maio 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2015000500003&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 28 jan. 2017.

HOYOS-LÓPEZ, R. *et al.* Molecular detection of *flaviviruses* and *alphaviruses* in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from coastal ecosystems in the Colombian Caribbean. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 111, n. 10, p. 625–634, out. 2016. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27706377>>. Acesso em: 22 mar. 2017.

HUTCHINGS, R. S. G.; SALLUM, M. A. M.; HUTCHINGS, R. W. Mosquito (Diptera: Culicidae) diversity of a forest-fragment mosaic in the Amazon rain forest. *Journal of medical entomology*, v. 48, n. 2, p. 173–87, mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21485352>>. Acesso em: 15 jun. 2017.

ICTV Virus Taxonomy 2015. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

JESSIE, K. *et al.* Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues, by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 189, n. 8, p. 1411–1418, 15 abr. 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/383043>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

JOHANSSON, M. A. *et al.* Zika and the Risk of Microcephaly. *New England Journal of Medicine*, v. 375, n. 1, p. 1–4, 7 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMp1605367>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

JORDAN, T. X.; RANDALL, G. *Flavivirus* modulation of cellular metabolism. *Current Opinion in Virology*, v. 19, p. 7–10, ago. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27280383>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of *alphavirus* replication and assembly and Assembly. p. 837–856, 2010.

JULIÃO, G. R. *et al.* Measuring Mosquito Diversity Patterns in an Amazonian Terra Firme Rain Forest. *Journal of Medical Entomology*, v. 47, n. 2, p. 121–128, 1 mar. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/47.2.121>>. Acesso em: 15 jun. 2017.

KASAI, S. *et al.* PCR-based identification of *Culex pipiens* complex collected in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, v. 61, n. 3, p. 184–191, 2008.

KHETARPAL, N.; KHANNA, I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. *Journal of Immunology Research*, v. 2016, p. 1–14, 2016. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27525287>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

KIMURA, M. Journal of Molecular Evolution A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *J. Mol. Evol*, v. 16, n. 1330, p. 111–120, 1980.

KLEMA, V. J. *et al.* Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Assembles into a Dimer with a Unique Methyltransferase and Polymerase Interface. *PLoS pathogens*, v. 12, n. 2, p. e1005451, fev. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26895240>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, p. msw054, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27004904>>.

KUNO, G.; CHANG, G.-J. J. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clinical microbiology reviews*, v. 18, n. 4, p. 608–37, out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16223950>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 11, p. 4066–4071, 2000.

LANE, J. *Neotropical Culicidae*. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000159&pid=S0085-5626201200030001600037&lng=en>. Acesso em: 27 maio 2017.

LAPORTA, G. Z. *et al.* Spatial distribution of arboviral mosquito vectors (Diptera, Culicidae) in Vale do Ribeira in the South-eastern Brazilian Atlantic Forest. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 28, n. 2, p. 229–238, 2012.

LAURITO, M. *et al.* COI barcode versus morphological identification of Culex (Culex) (Diptera: Culicidae) species: a case study using samples from Argentina and Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, p. 110–122, 2013.

LEUNG, J. Y.-S.; NG, M. M.-L.; CHU, J. J. H. Replication of *alphaviruses*: a review on the entry process of *alphaviruses* into cells. *Advances in virology*, v. 2011, p. 249640, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22312336>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerging microbes & infections*, v. 4, n. 3, p. e18, mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26038768>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

LONG, K. C. *et al.* Experimental Transmission of Mayaro Virus by *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, n. 4, p. 750–757, 1 out. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976583>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

LOPES, N.; NOZAMA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude*, v. 5, n. 3, p. 55–64, 2014. Disponível em: <<http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/rpas/v5n3/v5n3a07.pdf>>.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; LUZ, S. L. Simian Malaria at Two Sites in the Brazilian Amazon -II. Vertical Distribution and Frequency of Anopheline Species Inside and Outside the Forest. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 91, n. 6, p. 687–694, 1996. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v91n6/04.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2017.

MARCONDES, C. B.; CONTIGIANI, M.; GLEISER, R. M. Emergent and Reemergent Arboviruses in South America and the Caribbean: Why So Many and Why Now? *Journal of medical entomology*, p. 1–24, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28399216>>.

MILLER, B. R.; CRABTREE, M. B.; SAVAGE, H. M. Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect molecular biology*, v. 5, n. 2, p. 93–107, 1996.

MILLER, B. R.; MITCHELL, C. J.; BALLINGER, M. E. Replication, tissue tropisms and transmission of yellow fever virus in *Aedes albopictus*. v. 83, p. 252–255, 1989.

MOLINA-CRUZ, A. *et al.* Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection

and dissemination in *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 72, n. 5, p. 631–637, maio 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15891140>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. *Journal of Clinical Virology*, v. 64, p. 160–173, mar. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653214003692>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

MORELI, M. L.; COSTA, V. G. DA. A systematic review of molecular diagnostic methods for the detection of arboviruses in clinical specimens in Brazil and the importance of a differential diagnosis. *Virology Discovery*, v. 1, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <<http://www.hoajonline.com/virology/2052-6202/1/1>>.

MOTA, M. T. DE O. *et al.* Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. *Brazilian Journal of Microbiology*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27818091>>. Acesso em: 26 jan. 2017. , dez. 2016

MOUREAU, G. *et al.* New Insights into *Flavivirus* Evolution, Taxonomy and Biogeographic History, Extended by Analysis of Canonical and Alternative Coding Sequences. *PLOS ONE*, v. 10, n. 2, p. e0117849, 26 fev. 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0117849>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

MS. *Situação Epidemiológica / Dados de Febre Amarela*. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-febre-amarela>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

MUTEBI, J. P. *et al.* Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. *Journal of virology*, v. 75, n. 15, p. 6999–7008, ago. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11435580>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

NUNES, M. R. T. *et al.* Eco-epidemiologia dos arbovírus na área de influência da rodovia Cuiabá-Santarém (BR 163), Estado do Pará, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 25, n. 12, p. 2583–2602, dez. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2009001200006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 26 jan. 2017.

NUNES, M. R. T. *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*, v. 13, n. 1, p. 102, 30 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25976325>>. Acesso em: 28 jan. 2017.

O'GUINN, M. L. *et al.* Field detection of eastern equine encephalitis virus in the Amazon Basin region of Peru using reverse transcription-polymerase chain reaction adapted for field identification of arthropod-borne pathogens. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 70, n. 2, p. 164–71, fev. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993628>>. Acesso em: 13 maio 2017.

OLIVEIRA, E. R. A. *et al.* The *flavivirus* capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design. *Virus Research*, v. 227, p. 115–123, 2 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27751882>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

PAHO WHO / *Regional Zika Epidemiological Update (Americas) January 12, 2017*. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&id=11599&Itemid=41691>. Acesso em: 26 jan. 2017.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *The western journal of emergency medicine*, v. 17, n. 6, p. 671–679, nov. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27833670>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

PAUVOLID-CORRÊA, A. *et al.* Preliminary investigation of culicidae species in South Pantanal, Brazil and their potential importance in arbovirus transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 52, n. 1, p. 17–23, 2010.

PEREIRA SERRA, O. *et al.* Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiaba, state of Mato Grosso, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 111, n. 1, p. 20–29, 2016.

PERERA-LECOIN, M. *et al.* *Flavivirus* Entry Receptors: An Update. *Viruses*, v. 6, n. 1, p. 69–88, 30 dez. 2013. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/6/1/69>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

POWERS, A. M. *et al.* Evolutionary Relationships and Systematics of the *Alphaviruses*. *Journal of Virology*, v. 75, n. 21, p. 10118–10131, 1 nov. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11581380>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

POWERS, A. M. *et al.* Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *The Journal of general virology*, v. 81, n. Pt 2, p. 471–9, 1 fev. 2000. Disponível em: <<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-81-2-471>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

PUGEDO, H. *et al.* HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n. 1, p. 70–72, fev. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822005000100017&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 8 jun. 2017.

PUILLANDRE, N. *et al.* ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, v. 21, n. 8, p. 1864–1877, 2012.

QUARESMA, J. A. S. *et al.* Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Reviews in Medical Virology*, v. 23, n. 5, p. 305–318, set. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/rmv.1752>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

RASTOGI, M.; SHARMA, N.; SINGH, S. K. *Flavivirus* NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology journal*, v. 13, p. 131, 29 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27473856>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BARCODING, BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, v. 7, n. April 2016, p. 355–364, 2007.

REDDY, V. *et al.* Correlation of plasma viral loads and presence of Chikungunya IgM antibodies with cytokine/chemokine levels during acute Chikungunya virus infection. *Journal of Medical Virology*, v. 86, n. 8, p. 1393–1401, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24523146>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

REISEN, W. K. *et al.* Effect of temperature on the transmission of western equine encephalomyelitis and St. Louis encephalitis viruses by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 30(1), p. 151–160, 1993.

REISEN, W. K.; FANG, Y.; MARTINEZ, V. M. Effects of Temperature on the Transmission of West Nile Virus by *Culex tarsalis* (Diptera : Culicidae). p. 309–317, 2006.

ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 49, n. 1, p. 28–32, jan. 1955. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14373834>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

SAIZ, J.-C. *et al.* Zika Virus: the Latest Newcomer. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 496, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27148186>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

SALAZAR, M. I. *et al.* Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC microbiology*, v. 7, p. 9, 30 jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17263893>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

SALLUM, M. A. M. REVISÃO DA SEÇÃO SPISSIPES DE CULEX (MELANOCONION) (DIPTERA : CULICIDAE). 1994.

SALLUM, M. A. M.; FORATTINI, O. P. REVISION OF THE SPISSIPES SECTION OF CULEX (MELANOCONION) (DIPTERA: CULICIDAE). v. 12(3):517-, 1996. Disponível em: <http://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/JAMCA_V12_N3_P517-600.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2017.

SCHMALJOHN, A. L.; MCCLAIN, D. *Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae)*. [S.l.]: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413253>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

SCHUFFENECKER, I. *et al.* Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS medicine*, v. 3, n. 7, p. e263, jul. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16700631>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature*

Reviews Microbiology, v. 8, n. 7, p. 491–500, jul. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro2368>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

SILVA, J. W. P.; SILVA, J. W. P. Doença pelo vírus do Oeste do Nilo: um novo problema para o Brasil? *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, n. 3, p. 671–673, set. 2016. Disponível em: <http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000300671&scielo=S2237-96222016000300671>. Acesso em: 11 fev. 2017.

SIRIVANAKARN, S. A Review of the Systematics and a Proposed Scheme of Internal Classification of the New World Subgenus *Mdanoconifn*.of Cuhx. *Mosquito Systematics*, v. 14, n. 4, 1982. Disponível em: <<http://www.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/a512116.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2017.

SVS-MS. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 15, 2017. [S.d.]. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/05/Monitoramento-dos-casos-de-dengue-febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-virus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica.pdf>>. Acesso em: 18 maio 2017.

SVS-MS. FEBRE AMARELA - COES. Monitoramento DosCasos e Óbitos de Febre Amarela no Brasil - Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. [S.d.]. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/16/COES-FEBRE-AMARELA-INFORME-14-Atualizacao-em 10fev2017.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

SVS-MSa. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. [S.d.]. Disponível em: <http://combateaedes.saude.gov.br/images/boletins-epidemiologicos/2016-Dengue_Zika_Chikungunya-SE51.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2017.

TADEU, L.; FIGUEIREDO, M. Emergent arboviruses in Brazil Arboviroses emergentes no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 2, p. 224–229, 2007.

TADEU, L.; FIGUEIREDO, M. VÍRUS BRASILEIROS DA FAMÍLIA *BUNYAVIRIDAE*. 1999.

TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*, v. 6, n. 5, p. 389–402, 2005.

THOMAS, R. E. Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease: current perspectives. *Drug design, development and therapy*, v. 10, p. 3345–3353, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27784992>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

TOIVANEN, A. *Alphaviruses*: an emerging cause of arthritis? *Current Opinion in Rheumatology*, v. 20, n. 4, p. 486–490, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18525365>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

TORRES-GUTIERREZ, C. *et al.* Mitochondrial COI gene as a tool in the taxonomy of mosquitoes *Culex* subgenus *Melanoconion*. *Acta Tropica*, v. 164, p. 137–149, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.007>>.

TORRES-GUTIERREZ, C.; SALLUM, M. A. M. Catalog of the subgenus *Melanoconion* of *Culex* (Diptera: Culicidae) for South America. *Zootaxa*, v. 4028, n. 1, p. 1–50, 2015. Disponível em: <www.mapress.com/zootaxa/>. Acesso em: 27 maio 2017.

TSETSARKIN, K. A. *et al.* A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLoS Pathogens*, v. 3, n. 12, p. e201, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18069894>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

TURTLE, L.; GRIFFITHS, M. J.; SOLOMON, T. Encephalitis caused by *flaviviruses*. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*, v. 105, n. 3, p. 219–23, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22367423>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

VASCONCELOS, P. F. DA C. *et al.* Primeiro registro de epidemias causadas pelo vírus Oropouche nos Estados do Maranhão e Goiás, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 31, n. 4, p. 271–278, ago. 1989. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46651989000400011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 26 jan. 2017.

VASCONCELOS, P. E. C. *et al.* Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. 1992.

VIANA, L. A. *et al.* Caiman-Biting Mosquitoes and the Natural Vectors of *Hepatozoon caimani* in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 47, n. 4, p. 670–676, 1 jul. 2010. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/47.4.670>>. Acesso em: 15 jun. 2017.

VIEIRA, M. A. C. S. *et al.* West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 93, n. 2, p. 377–9, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26055749>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

VOLK, D. E. *et al.* Structure of yellow fever virus envelope protein domain III. *Virology*, v. 394, n. 1, p. 12–18, 10 nov. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19818466>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

WANG, E. *et al.* Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *Journal of virology*, v. 74, n. 7, p. 3227–34, abr. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10708439>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

WEAVER, S. C. *et al.* *Alphaviruses*: Population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Research*, v. 94, n. 3, p. 242–257, jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22522323>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

WEAVER, S. C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: Mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends in Microbiology*, v. 21, n. 8, p. 360–363, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2013.03.003>>.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. *Antiviral research*, v. 85, n. 2, p. 328–45, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19857523>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

WEBB, C. E. *et al.* Vector competence of three Australian mosquitoes, *Verrallina carmenti*, *Verrallina lineata*, and *Mansonia septempunctata* (Diptera: Culicidae), for Ross River virus. *Journal of medical entomology*, v. 45, n. 4, p. 737–40, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18714876>>. Acesso em: 13 maio 2017.

WHO. Zika virus and complications. *WHO*, [S.d.]. Disponível em: <<http://www.who.int/emergencies/zika-virus/en/>>. Acesso em: 27 jan. 2017.

WHO | Dengue and severe dengue. *WHO*, [S.d.]. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

WILKERSON, R. C. *et al.* Making Mosquito Taxonomy Useful : A Stable Classification of Tribe Aedini that Balances Utility with Current Knowledge of Evolutionary Relationships. p. 1–26, 2015.

WONG, P.-S. J. *et al.* Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 8, p. e2348, 1 ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23936579>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

WU, S.-J. L. *et al.* Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature Medicine*, v. 6, n. 7, p. 816–820, 1 jul. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888933>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

ZHANG, C. *et al.* Structure of the NS5 methyltransferase from Zika virus and implications in inhibitor design. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 17 nov. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27866982>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

ANEXO A - Protocolo de autorização expedido pelo SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42353-2	Data da Emissão: 20/02/2015 19:34	Data para Revalidação*: 21/03/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Maisa da Silva Araújo	CPF: 740.785.002-00
Título do Projeto: Distribuição vertical de potenciais vetores envolvidos na transmissão da malária símia e de arboviroses no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental, Brasil	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0066-80

ANEXO B - Exemplo de Prancha Pictórica para determinação de morfoespécies de *Culex* spp. durante as capturas em três áreas florestais de Rondônia



PROJETO: DISTRIBUIÇÃO VERTICAL DE POTENCIAIS VETORES ENVOLVIDOS NA TRANSMISSÃO DA MALÁRIA SÍMIA E DE ARBOVIROSES EM TRÊS LOCALIDADES NO ESTADO DE RONDÔNIA, AMAZÔNIA OCIDENTAL, BRASIL.

Morfoespécie CULEX 02 – *Culex (Melanoconion)* sp. 2



Occipício: escamas brancas (tom azul claro) largas laterais. Cerdas douradas e escuras deitadas na área central, cerdas forquilhadas pretas/marrons misturadas e esparsas. Cerdas pretas longas, ultrapassam occipício.



Escudo: cerdas acrosticais ausentes na área central. Cerdas douradas em mancha anterolateral. Pruinosidade branca em boa parte do escudo.

Pleura Torácica: Tegumento marrom escuro com pruinosidade branca. Cerdas **mesepimeral inferior** única.

Tergitos abdominais totalmente escuros, exceto por pequena área basolateral clara.

Esternitos abdominais unicolor marrom claro.



Elaborado por: GRJuliano
em 18.09.2014

Chamada Universal - MCTI/CNPQ No.14/2013 (Processo: 477490/2013-1) e Chamada Mudança de Titularidade Proj ED Universal 2013 por falecimento do Titular Prof Luiz Hildebrando (Processo: 400238/2015-2)